



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

 Facultat de Ciències Biològiques

Grado en Bioquímica y Ciencias Biomédicas

Trabajo Fin de Grado

---

## Desarrollo de Aptazovid: aptasensor piezoeléctrico para la detección de SARS-CoV-2

---

**Autora:**

Aleksandra Norczyk Simón

**Tutora:**

María Micaela Molina Navarro

**Mayo de 2021**



## Resumen:

SARS-CoV-2 ha dado lugar a una pandemia en la que la detección y aislamiento de personas infectadas es clave para luchar contra el virus. La detección puede ser directa o indirecta con diferentes dianas y muestras de partida, aplicando técnicas tan conocidas como la RT-PCR o desarrollando nuevos métodos que integran herramientas como CRISPR, aunque con ciertas limitaciones. Desde hace algún tiempo, los biosensores están en auge y la pandemia ha favorecido la inversión en el desarrollo de tecnologías que superen los inconvenientes de metodologías más tradicionales. En este contexto, como solución surge Aptazovid, un aptasensor piezoeléctrico que detecta directamente la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2 de forma ultrasensible, específica, rápida y a pie de cama. Aptazovid funciona como una microbalanza basada en piezoelectricidad, de modo que la unión de partículas víricas se registra como una disminución de frecuencia. Los viriones se capturan mediante aptámeros inmovilizados en una plataforma de cristal de cuarzo y se amplifica la señal a través de nanopérlas magnéticas con aptámeros que reconocen otra región de la proteína S de SARS-CoV-2, formando un complejo en formato sándwich. Aptazovid es el primer método de diagnóstico de la empresa Aptazogen, comercializándose como un kit dirigido a centros sanitarios y como un servicio de diagnóstico para la población general, en ambos casos a bajo coste, por lo que resulta considerablemente más accesible que técnicas tradicionales.

## Abstract:

SARS-CoV-2 has originated a pandemic where detection and isolation of infected people is key when it comes to fighting the virus. Detection might be direct or indirect with different targets and samples, using well known techniques such as RT-PCR or developing new ones that allow to integrate tools like CRISPR, although not free of limitations. For some time now, biosensors are on the upswing and the pandemic has favored investing in the development of technologies to overcome the drawbacks of traditional methodologies. In this context, Aptazovid arises as a solution. It is a piezoelectric aptasensor which directly detects the surface glycoprotein (S) of SARS-CoV-2 ultrasensibly and specifically and it is a fast point-of-care technique. Aptazovid works as a microbalance based in piezoelectricity, so the attachment of viral particles is registered as a reduction of frequency. Virions are captured through aptamers immobilized in a quartz crystal platform and the signal is amplified with magnetic nanobeads which have aptamers recognizing another region of the S protein of SARS-CoV-2, leading to a sandwich type complex. Aptazovid is the first diagnostic method of the company Aptazogen, commercialized as a kit oriented to health facilities and as a service oriented to the general population, at a low cost in both cases, so it is considerably more accessible than traditional techniques.



## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	Muestras biológicas.....	3
1.2.	Estado de la técnica o “state of the art” .....	3
1.2.1.	Detección de material genético viral .....	4
1.2.2.	Daño tisular .....	7
1.2.3.	Pruebas de anticuerpos.....	8
1.2.4.	Detección de antígenos.....	9
2.	Diseño de un biosensor piezoeléctrico .....	10
2.1.	Piezoelectricidad .....	10
2.2.	Biodiana.....	10
2.3.	Biorreconocimiento.....	11
2.4.	Complementos electrónicos .....	12
3.	Propuesta experimental para el desarrollo de un aptasensor piezoeléctrico .....	13
3.1.	Objetivos .....	13
3.1.1.	Clonación del gen de la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2 .....	13
3.1.2.	Expresión de la proteína S y su purificación.....	16
3.1.3.	Selección de aptámeros por SELEX .....	17
3.1.4.	Inmovilización de aptámeros en QMC .....	19
3.1.5.	Inmovilización de aptámeros en nanopérlas magnéticas .....	20
4.	Validación del método como prueba diagnóstica.....	20
4.1.	Ensayo piezoeléctrico.....	20
4.2.	Calibrado .....	21
4.3.	Sensibilidad y especificidad clínicas y razón de verosimilitud .....	21
4.4.	Valor predictivo positivo y negativo.....	22
4.5.	Curva ROC.....	22
5.	Aptazovid, primera prueba diagnóstica de Aptazogen .....	23
5.1.	Acerca de Aptazogen. Misión, visión y valores .....	23
5.2.	Balance de costes .....	23
5.2.1.	Puesta en marcha de Aptazogen.....	23
5.2.2.	Coste de la prueba diagnóstica .....	23
5.3.	Aptazovid. Líneas principales de negocio .....	24
5.3.1.	Comercialización del kit Aptazovid .....	24
5.3.2.	Servicio de diagnóstico Aptazovid.....	24

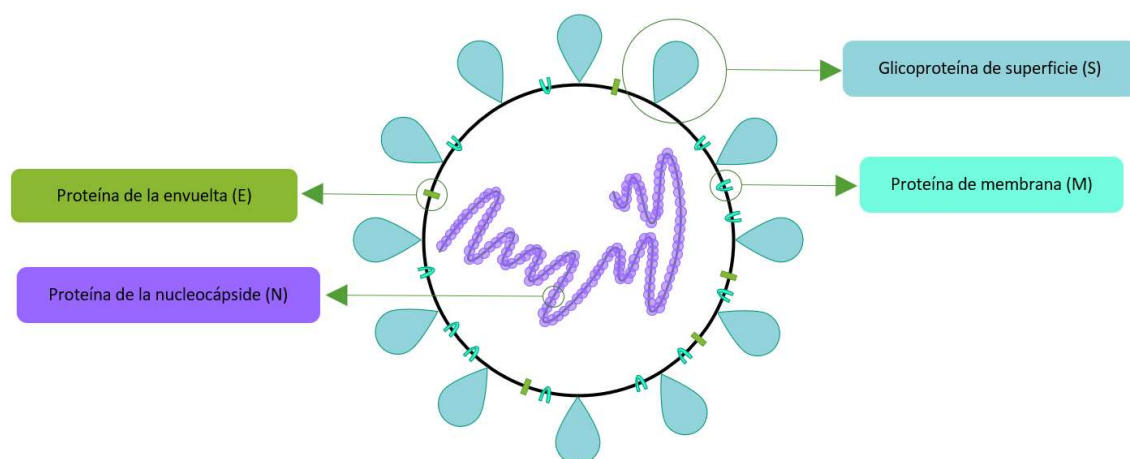
5.4.	Estrategias a corto, medio y largo plazo .....	25
6.	Conclusiones y consideraciones futuras .....	25
7.	Bibliografía .....	26
8.	Anexo I.....	31
9.	Anexo II.....	33

## 1. Introducción

Los coronavirus pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales*. Son virus zoonóticos, de los cuales los géneros  $\alpha$  y  $\beta$  pueden ser transmitidos de animales a humanos, y de humanos a humanos una vez adaptados; mientras que los subtipos  $\gamma$  y  $\delta$  solo se encuentran en animales. Los reservorios animales incluyen murciélagos, ganado, cerdos y camellos. Desde 1960 se han registrado infecciones en humanos por los  $\alpha$ -coronavirus 229E y NL63, y los  $\beta$ -coronavirus OC43 y HKU1, aunque con baja patogenicidad, dando síntomas de resfriado común. Desde el comienzo del siglo XXI ha habido tres  $\beta$ -coronavirus que han dado brotes zoonóticos muy patogénicos: el coronavirus del síndrome respiratorio severo agudo (SARS-CoV) en 2002, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en 2012 y el coronavirus del síndrome respiratorio severo agudo 2 (SARS-CoV-2) en 2019.<sup>1-7</sup>

SARS-CoV-2 es el virus que causa la enfermedad de coronavirus 2019 (COVID-19). Se registró por primera vez en la ciudad china de Wuhan, notificándose en diciembre de 2019 a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la presencia de 44 afectados de una neumonía atípica en China. SARS-CoV-2 se aisló como un nuevo coronavirus en enero de 2020 y se extendió a nivel mundial hasta dar lugar a una pandemia, declarada como tal el 12 de marzo de 2020 por el Director General de la OMS.<sup>7,8</sup>

SARS-CoV-2 pertenece al subgénero *Sarbecovirus* y es un virus con envuelta y genoma de RNA de simple cadena (ssRNA) de sentido positivo, aproximadamente de 30 kb. Dos tercios de éste corresponden principalmente a las secuencias de la pauta abierta de lectura de la replicasa (ORF1ab) y un tercio a genes que codifican las proteínas estructurales (**Figura 1**) glicoproteína de superficie o espícula (S), proteína de la envuelta (E), proteína de membrana (M) y proteína de la nucleocápside (N).<sup>7,9,10</sup>



**Figura 1.** Proteínas estructurales de SARS-CoV-2.

La patogenicidad de SARS-CoV-2 viene dada mayormente por las proteínas S y N. SARS-CoV-2, al igual que el previo SARS-CoV, emplea su proteína S y la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2) como receptor para su entrada en las células del huésped. La afinidad de la proteína S de SARS-CoV-2 por ACE2 es mayor que la de SARS-CoV, lo que aumenta la transmisión

vírica. Por su parte, la proteína N forma un complejo ribonucleoproteico con el genoma viral, siendo clave en el empaquetamiento de las partículas víricas.<sup>7,8,10-12</sup>

COVID-19 se puede manifestar con tos seca, fiebre, dolor de cabeza, cansancio, hiposmia e hipogeusia, entre otros síntomas. Los casos más graves presentan daño cardíaco, de riñón, hepático y respiratorio, o incluso muerte, y tienden a darse en pacientes de edad avanzada o con patologías previas. SARS-CoV-2 se transmite por contacto humano a través de material respiratorio liberado al respirar, toser o estornudar. El tiempo medio de incubación son cuatro días. Sin embargo, las personas infectadas pueden ser asintomáticas y transmisoras, lo que puede dar lugar a infraestimar el número de casos positivos y favorece la transmisión.<sup>7,8,10,11</sup>

La severidad y fácil transmisión de SARS-CoV-2 provoca la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico específicos, sensibles y rápidos para controlar la pandemia, especialmente técnicas en el lugar de asistencia o “point-of-care”. Estos métodos se refieren a aquellos en los que no se necesita mandar la muestra a un laboratorio y tienden a dar resultados más rápido que otras técnicas tradicionales. Son especialmente útiles en áreas remotas con infraestructuras de laboratorio escasas.<sup>13</sup>

Las técnicas en desarrollo deben validarse a través de sus sensibilidades y especificidades analíticas y clínicas. La sensibilidad analítica o límite de detección viene determinada por la mínima concentración detectable de una sustancia en una muestra. La especificidad analítica indica la capacidad de detectar la sustancia de interés en un organismo sin reactividad cruzada con otras sustancias. Por su parte, la sensibilidad clínica se refiere a la proporción de positivos detectados con la prueba dentro del total de positivos, mientras que la especificidad clínica mide la proporción de negativos detectados dentro del total de negativos. Una menor sensibilidad clínica implica más falsos negativos y, menor especificidad clínica, más falsos positivos. Los falsos negativos suponen que personas infectadas puedan transmitir el virus libremente, mientras que falsos positivos implican confinamientos y rastreos innecesarios y retraso en el diagnóstico adecuado en presencia de síntomas. Las propiedades analíticas y clínicas descritas no tienen por qué correlacionarse.<sup>8,11,14</sup>

Los valores predictivos positivo y negativo (PPV y NPV, respectivamente) de las pruebas diagnósticas también deben considerarse y vienen influenciados por la prevalencia de la enfermedad (casos existentes) y la sensibilidad y especificidad de la prueba.<sup>8,14</sup>

En España, a 25 de abril de 2021 se han completado cuatro rondas del estudio ENE-COVID (Estudio Nacional de sero-Epidemiología de la Infección por SARS-CoV-2 en España), en el cual la prevalencia de infección por SARS-CoV-2 se ha estimado como seroprevalencia, determinando la presencia de anticuerpos generados frente al virus. Se habla de prevalencia acumulada o global en referencia al porcentaje de personas en la población que han desarrollado anticuerpos en algún momento desde el inicio del estudio, aunque ya no sean detectables. La prevalencia actual estima el porcentaje de población que tiene anticuerpos detectables en una determinada ronda del estudio. La cuarta ronda se realizó en noviembre de 2020, arrojando una prevalencia global del 9.9% y una prevalencia actual del 7.1%, que es relativamente baja.<sup>15</sup>



### 1.1. Muestras biológicas

Más adelante se revisarán los métodos de diagnóstico existentes, pero antes conviene conocer los distintos tipos de muestras que se pueden emplear para las pruebas. Se pueden tomar muestras nasofaríngeas, orofaríngeas, frotis nasales, saliva, muestras del tracto respiratorio inferior por aspirados, lavados broncoalveolares y esputos; sangre y heces. Las muestras se pueden almacenar hasta 72 horas a 4 °C <sup>16</sup>. Las muestras más frecuentes son los exudados nasofaríngeos, pero requieren personal entrenado; mientras que los nasales pueden ser tomados por el propio paciente, aunque no proporcionan óptima sensibilidad. Si no se pueden obtener las anteriores, se recurre a muestras orofaríngeas, aunque éstas también se pueden combinar con nasofaríngeas para aumentar el rendimiento del diagnóstico. <sup>6,7,17</sup> Otra opción es emplear saliva, que disminuye el riesgo de contagio para los sanitarios. <sup>13,18</sup>

A lo largo de la primera semana de infección el virus se desplaza hacia las partes inferiores del tracto respiratorio, por lo que es preferible tomar muestras de estas zonas conforme avanza la enfermedad o en pacientes negativos, pero de alta sospecha clínica, ya que aporta mayor sensibilidad. No obstante, realizar una broncoscopia para obtener muestras es un procedimiento invasivo, por lo que es preferible recoger esputo si es generado. Para pacientes sintomáticos en los primeros días de infección o para pacientes asintomáticos se recomienda tomar la muestra del tracto respiratorio superior. <sup>6,7,17</sup>

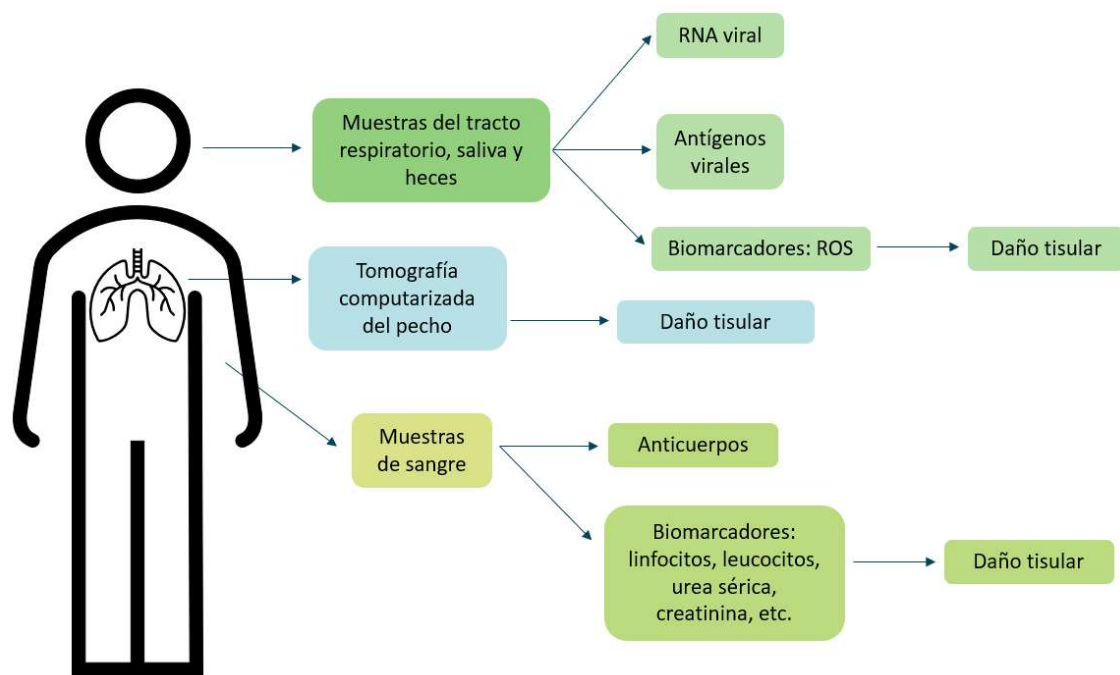
En plasma es poco frecuente encontrar SARS-CoV-2, exceptuando pacientes graves, pero es útil para realizar pruebas de anticuerpos. En pacientes muy enfermos también se puede encontrar el virus en heces hacia la segunda semana de la infección puesto que éste se puede reproducir en enterocitos que expresen ACE2 y sirve de advertencia de la gravedad. En pacientes negativos tomando otros tipos de muestras, pero con alta sospecha clínica, se pueden emplear muestras fecales también. <sup>11,17</sup>

Para tomar muestras se recomienda usar hisopos de aluminio o plástico con el extremo recubierto de fibras sintéticas como nylon y evitar aquellos con alginato de calcio, algodón o madera puesto que podrían inactivar el virus o inhibir la prueba diagnóstica. <sup>16,19</sup>

Algunas compañías ofrecen kits para tomar la muestra en casa y enviarla directamente al laboratorio que realizará la prueba, reduciendo el riesgo de exposición del personal y la necesidad de desconfinarse de los pacientes. Como muestras, se pueden realizar frotis nasofaríngeos u orales o tomas de muestras de sangre. Algunas limitaciones son el riesgo de fallos en la toma de muestra y el tiempo de envío de la muestra y de la realización de la prueba en el laboratorio. <sup>8</sup>

### 1.2. Estado de la técnica o “state of the art”

En los siguientes apartados se van a revisar las distintas técnicas empleadas en la detección directa o indirecta de SARS-CoV-2, clasificadas en función de la diana a identificar (material genético, daño tisular, anticuerpos generados y antígenos virales). En la **Figura 2** se resumen las posibles dianas a detectar en función de la muestra.



**Figura 2.** *Dianas identificables en función de la muestra de partida. RNA y antígenos virales permiten una detección directa de SARS-CoV-2, mientras que diferentes biomarcadores, análisis de imagen por tomografía computarizada y anticuerpos suponen una detección indirecta con distinto grado de especificidad.*

Algunos métodos hacen referencia a biosensores, que están compuestos de un biorreceptor y un transductor que traduzca el reconocimiento de la diana en una señal eléctrica medible. Seguidamente se emplea un amplificador de la señal y un procesador de la señal. Los transductores se pueden clasificar como ópticos, electroquímicos o basados en masa. Dentro de los ópticos se incluye la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y Raman, resonancia plasmónica de superficie y fibras ópticas, entre otros. Como transductores electroquímicos hay métodos amperométricos, potenciométricos, impedimétricos y conductométricos. Los basados en masa usan propiedades piezoeléctricas o magnetoelásticas.<sup>20</sup>

### 1.2.1. Detección de material genético viral

La técnica de referencia o “gold standard” para la detección de COVID-19 es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tecnología de amplificación de ácidos nucleicos que permite detectar el genoma viral con alta sensibilidad. Puesto que el genoma de SARS-CoV-2 es de RNA, predomina el uso de PCR combinada con transcripción reversa (RT-PCR), realizable en una reacción o en dos. Si se llevan a cabo dos reacciones, primero se emplea una transcriptasa reversa para generar DNA complementario (cDNA) a partir del RNA viral y, más tarde, amplificación del cDNA mediante cebadores específicos. Para la segunda reacción está muy extendido el uso de la RT-PCR a tiempo real (rRT-PCR o RT-qPCR), por la que se cuantifican los productos de PCR a medida que se generan gracias al uso de sondas fluorescentes como las sondas de hidrólisis TaqMan. Realizar una sola reacción es más rápido, aunque se producen menos copias de la región de interés, dando menor sensibilidad analítica.<sup>6-8,10,13,14</sup>

Previamente es necesario extraer el RNA de la muestra, paso de baja eficacia por su fácil degradación y que limita el proceso, dando falsos negativos. Otras limitaciones son la toma y tipo de muestra, su transporte y almacenamiento. Respecto a la toma de la muestra, es frecuente encontrar falsos negativos si se realiza en los primeros días de la infección debido a una carga viral insuficiente para la prueba. Sería necesario tomar muestras de diferentes partes del cuerpo o repetir la prueba con varios días de diferencia. Tomar la muestra de uno a tres días desde el comienzo de los síntomas ya reduce significativamente la probabilidad de un falso negativo. Además, se han registrado pacientes con la enfermedad resuelta que continúan siendo positivos hasta 37 días tras el inicio de los síntomas debido a trazas de RNA viral que no indican que esté presente el virus activo. Los falsos positivos son más escasos, pero posibles principalmente por contaminación de muestras o reactivos.<sup>6-8,10,13,14</sup>

Si la prevalencia del virus es baja, como es el caso de España, una forma de aumentar la eficiencia es usar “pools”, donde se combinan una serie de muestras para realizar una sola prueba. Si el resultado es negativo, todas las muestras incluidas serían negativas, mientras que si es positivo se realizaría la prueba a cada muestra individual. No obstante, puede aumentar el porcentaje de falsos negativos.<sup>6,11,14,21</sup>

Las secuencias diana para rRT-PCR son variables, incluyendo los genes virales N, E, S y ORF1a/b (incluye el gen de la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRP)). Gran parte de los kits proporcionan cebadores y sondas únicamente para RdRP y E debido a que cuentan con un límite de detección más bajo y, RdRP en concreto, evita reacciones cruzadas con otros coronavirus patógenos y patógenos respiratorios humanos. Además, es necesario considerar las posibles mutaciones que darían pérdida de sensibilidad de las pruebas, mitigable empleando varias secuencias diana. Los kits también incluyen las enzimas para la transcripción reversa y la amplificación, y los reactivos de controles negativos, positivos e internos para minimizar los falsos positivos y falsos negativos, además de detectar errores experimentales. Para PCR, emplear muestras de esputo tiende a dar un diagnóstico más sensible puesto que el virus se desplaza y acumula en el tracto respiratorio inferior con el tiempo, pero no todos los pacientes generan suficiente como para recogerlo sin recurrir a una técnica invasiva.<sup>6-8,10,22</sup>

Una alternativa de amplificación de ácidos nucleicos es la amplificación isotérmica, que no requiere de termociclador, reduciendo el tiempo y coste de la prueba. De ésta se deriva la técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), que requiere desnaturalización previa del material genético. Puede ser a tiempo real empleando fluorocromos y en formato multiplex (RT-NASBA), siendo más sensible y rápida que una RT-PCR multiplex.<sup>13,21,23</sup> NASBA se ha combinado con secuenciación de siguiente generación dando lugar a INSIGHT (Isothermal NASBA Sequencing-Based High-Throughput test) para detección de COVID-19.<sup>24</sup>

Por otro lado, está la amplificación isotérmica de tipo LAMP (loop-mediated isothermal amplification), combinable con transcripción reversa y a tiempo real (rRT-LAMP). LAMP necesita de cuatro o seis cebadores internos o externos que permiten síntesis de DNA con desplazamiento de cadena de forma autocíclica, generando una estructura en forma de mancuerna que dará concatémicos. La detección de DNA puede ser colorimétrica, por fluorescencia, indicadores de pH, turbidez o análisis en geles de agarosa, facilitando el diagnóstico. La sensibilidad es variable, pero es más específica que la RT-PCR al usar más

cebadores y también más rápida, además de que se reduce el ruido de fondo y no es necesario un termociclador. No obstante, algunas limitaciones son el diseño de los cebadores y la elección del tiempo y temperatura de reacción, además de que suele seguir siendo necesario un paso previo de extracción de RNA.<sup>8,10,25</sup>

A raíz de LAMP se desarrolló RAMP<sup>26</sup>, que utiliza LAMP y amplificación por polimerasa recombinasa (RPA). RAMP se ha aplicado para detección de COVID-19 (COVID-19 Penn-RAMP) con mayor sensibilidad que LAMP y detección colorimétrica o por fluorescencia<sup>27</sup>. Penn-RAMP emplea cebadores de tipo LAMP en una primera reacción y cebadores RAMP en una segunda reacción<sup>13</sup>.

Para aumentar la sensibilidad se puede acoplar un ensayo de un biosensor de flujo lateral basado en nanopartículas (LFB)<sup>28</sup>. Los ensayos de flujo lateral (LFA) se emplean en diversas técnicas y se volverán a mencionar más adelante. Estos sistemas incluyen generalmente una almohadilla donde depositar la muestra, una almohadilla de unión a anticuerpos o antígenos conjugados con etiquetas, una membrana que facilita el movimiento de la muestra por capilaridad hasta una línea control y una línea de prueba, y una almohadilla de absorción que capta el resto de la muestra. Las etiquetas pueden ser de materiales como oro coloidal, carbón o látex. El biomarcador de interés se unirá a su antígeno o anticuerpo conjugado específico en la almohadilla de conjugación y, anticuerpos específicos del biomarcador u otros agentes de captura inmovilizados, retendrán el complejo en la línea de prueba. Anticuerpos control marcados se unen a anticuerpos inmovilizados en la línea control.<sup>10</sup> Las pruebas que usan LFA aportan rapidez y bajo coste, aunque su sensibilidad es discutible<sup>6</sup>. El biosensor de LFA basado en nanopartículas se basa en la generación de amplicones marcados que pueden ser detectados por inmunorreacciones o por interacciones biotina-estreptavidina<sup>28</sup>.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) es ampliamente reconocido como herramienta para edición genética, sin embargo, se suman aplicaciones como la detección de COVID-19, dirigiendo a la enzima Cas hacia regiones diana de interés, y muchas tienen potencial como métodos en el lugar de asistencia. Una de estas técnicas se conoce como SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) y combina la amplificación isotérmica por polimerasa recombinasa con Cas13a, incluyendo una sonda fluorescente de RNA. Cuando Cas13a encuentre su secuencia diana (ORF1ab y gen S) en el RNA viral, se activará y cortará otros ssRNA inespecíficos (escisión colateral) como el reportero fluorescente, indicando la presencia de la secuencia diana original en una tira de papel por flujo lateral. SHERLOCK es de bajo coste, alta especificidad y sensibilidad, aunque el diseño supone una limitación. Como derivación se ha desarrollado CARMEN, que usa lo anterior junto con chips microfluídicos.<sup>8,10</sup>

DETECTR, opvCRISPR y AIOD-CRISPR son también sistemas basados en CRISPR que emplean LAMP o RPA junto con Cas12a para detección viral.<sup>8,10,21,29,30</sup> CREST, por su parte, utiliza RT-PCR, en lugar de amplificación isotérmica, y Cas13, siendo barato, pero sensible<sup>31</sup>.

La tecnología CRISPR se puede acoplar a transistores de efecto campo (FET) en láminas de grafeno, produciendo biosensores CRISPR-Chips con alta sensibilidad. La unión de la biomolécula, en este caso unión del gen diana al complejo CRISPR, provoca un cambio en la distribución de carga en superficie que se mide como conductancia, aunque con cierto ruido.

<sup>7,10,32</sup>

Por otro lado, se han desarrollado biosensores de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 que utilizan efecto fototérmico plasmónico (PPT) y detección de resonancia plasmónica localizada en superficie (LSPR). El sensor incluye nanoislas de oro en dos dimensiones (AuNIs), que son nanopartículas plasmónicas con una secuencia complementaria al ácido nucleico viral y cuentan con efecto termoplasmónico que aumenta la temperatura de hibridación ayudando a discriminar genes virales. El sensor detecta oscilaciones de resonancia localizada en la superficie de conducción de electrones en presencia del biomarcador. La unión de la secuencia diana en la superficie de las nanopartículas cambia el índice de refracción. Se ha empleado para detectar el gen RdRp, el gen E y regiones de ORF1a con éxito.<sup>7,10</sup>

Conviene considerar que SARS-CoV-2 acumula una media de dos mutaciones al mes, de forma se puede hacer un análisis filogenético de la dispersión del virus mediante secuenciación. También se puede realizar diagnóstico mediante secuenciación de siguiente generación (NGS) o secuenciación Sanger, aunque es costoso.<sup>21</sup>

### 1.2.2. Daño tisular

Las consecuencias tisulares de COVID-19 incluyen inflamación, cambios en el parénquima y muerte celular en el sistema respiratorio, entre otros. Estos efectos son observables como opacidades de vidrio esmerilado mediante tomografía computarizada (CT). Esta técnica toma imágenes de rayos-X desde diferentes ángulos para generar una imagen completa de forma no invasiva. La CT se ha considerado el segundo método más sensible para detección de SARS-CoV-2, aunque la sensibilidad se puede haber sobreestimado por inclusión sesgada de pacientes en estudios.<sup>10,14,19,22,33,34</sup>

A diferencia de infecciones por MERS-CoV y SARS-CoV, en COVID-19 es más frecuente que estén afectados los dos pulmones, aportando cierta especificidad. No obstante, la especificidad es baja, de forma que esta técnica se puede emplear como diagnóstico suplementaria o para evaluar la gravedad de la enfermedad. Sirve como diagnóstico adicional incluso para asintomáticos o pacientes con RT-PCR negativa y síntomas.<sup>10,14,19,22,33,34</sup>

Como desventajas adicionales, esta técnica requiere maquinaria de alto coste y personal especializado para el diagnóstico, además de tiempo de limpieza de la maquinaria tras cada paciente. Una alternativa más económica e implantada en la mayoría de los hospitales son rayos-X convencionales, a los que se puede acoplar diagnóstico asistido por inteligencia artificial como COVID-Net, aportando sensibilidad, especificidad y cuantificación de la porción pulmonar afectada.<sup>10,14,19</sup>

Influenza (más conocida como gripe) y COVID-19 pueden ser mal diagnosticadas en función de los síntomas, aunque pacientes fibróticos con infección pulmonar crónica o con asma o neumonía aguda presentan niveles más elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pacientes con influenza. Por ello se ha desarrollado un biosensor electroquímico a tiempo real para detectar los niveles de ROS en esputo como biomarcador. No obstante, no se podría usar en solitario para diagnóstico de COVID-19.<sup>10</sup>

En pacientes de COVID-19 también se pueden encontrar niveles elevados de proteína C reactiva, dímero D, linfocitos, leucocitos y plaquetas, entre otros. Los pacientes más graves pueden tener linfopenia y niveles más altos de urea sérica, lactato deshidrogenasa, protrombina, etc. El inconveniente es la inespecificidad de estos biomarcadores.<sup>10,14</sup>

### 1.2.3. Pruebas de anticuerpos

Un anticuerpo o inmunoglobulina (Ig) es una proteína que se une específicamente a un antígeno y es producida por el sistema inmune en respuesta al mismo antígeno. Son secretados en mucosas y sangre, neutralizan patógenos y evitan así la propagación de la infección.<sup>7,22</sup>

Con las pruebas de anticuerpos o serológicas se busca detectar aquellos anticuerpos en sangre que reconocen proteínas estructurales de SARS-CoV-2 como las proteínas N y S, incluyendo de esta última las subunidades S1, S2 y el dominio de unión al receptor (RBD). Los isotipos detectados frente a SARS-CoV-2 son IgM, IgG, IgA, anticuerpos totales o combinaciones de isotipos, siendo preferible la detección de IgG por su mayor especificidad. El mayor inconveniente de estas pruebas es la reactividad cruzada, reduciendo la especificidad y dando más falsos positivos, los cuales llevarían a una sensación de falsa seguridad. La proteína N está más conservada evolutivamente que la S, y dentro de ésta, la subunidad RBD, dando mayor reactividad cruzada. En diagnóstico temprano, la proteína N puede ser el antígeno inmunodominante, lo que se podría deber, en parte, a inmunidad previa frente a SARS-CoV.<sup>7,8,10,11,22</sup>

Además, la respuesta inmune tarda en desarrollarse de una a dos semanas, dando un porcentaje elevado de falsos negativos en los primeros días de la infección, de manera que no se puede usar como único método de diagnóstico. Algunas personas ni siquiera llegan a desarrollar anticuerpos o no en cantidades detectables, pero sí superan la enfermedad. Por su parte, los pacientes asintomáticos presentan niveles más bajos de anticuerpos que los sintomáticos y pueden no desarrollar seroconversión de diferentes clases de anticuerpos.<sup>7,8,22</sup>

No obstante, determinar qué personas cuentan con anticuerpos protectores frente al virus puede ser útil para encontrar posibles donantes de plasma y emplear este último como tratamiento para enfermos. Además, permite estudiar la duración de la inmunidad y distinguir a personas que hayan pasado la enfermedad de aquellas inmunizadas gracias a vacunas basadas en la proteína S, pues éstas últimas no tendrían anticuerpos frente a la proteína N. Otros beneficios son la rapidez de la prueba, su bajo coste y que, como prueba no diagnóstica, los falsos negativos no influirían sobre la transmisión vírica tanto como los de pruebas diagnósticas.<sup>6-8,14,22</sup>

Dos opciones muy extendidas en pruebas de anticuerpos son ensayos LFA y ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En los segundos se emplean anticuerpos conjugados con una enzima u otro marcador y existen diferentes aproximaciones en función de la molécula diana y los recursos disponibles, como ELISA directo, indirecto, competitivo o sándwich. En serologías por SARS-CoV-2 es común emplear ELISAs indirectos, donde los posibles anticuerpos séricos actúan como anticuerpos primarios frente a antígenos recombinantes y estos anticuerpos primarios son reconocidos por anticuerpos secundarios marcados. También se

puede detectar el anticuerpo secundario por un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) o por ensayos de fluorescencia intensificados por ciclos de amplificación (CEFA). Al contrario que con LFA, las pruebas basadas en ELISA se deben realizar en un laboratorio, lo que supone una limitación, aunque son más sensibles, por lo que se pueden usar volúmenes de reacción pequeños, reduciendo el coste.<sup>6-8,20</sup>

Por otro lado, se han desarrollado métodos de LFA basados en resonancia plasmónica de superficie (SPR), que emplean partículas de oro con la proteína de N de SARS-CoV-2 para detectar anticuerpos en suero o comparar afinidades de unión de anticuerpos con mayor sensibilidad.<sup>7</sup>

#### 1.2.4. Detección de antígenos

Un antígeno es una molécula que puede ser reconocida por el sistema inmunitario desencadenando una respuesta inmune. Las pruebas de antígenos detectan proteínas virales, generalmente tomando muestras orofaríngeas, nasofaríngeas o nasales. Las dianas más empleadas son las proteínas N, por su gran expresión desde infección temprana, y S, puesto que está presente en gran densidad en la superficie externa de SARS-CoV-2.<sup>7,10,17,35</sup>

Estas pruebas tienden a no necesitar equipamiento específico de laboratorio o personal entrenado, son de bajo coste y generan resultados en 15-20 minutos, por lo que tienen potencial como técnicas en el lugar de asistencia. No obstante, estos métodos no suelen amplificar la molécula diana, dando una sensibilidad reducida, de modo que es preferible emplearlos con cargas virales altas, a los 5-7 días del comienzo de los síntomas. La sensibilidad media de las pruebas de antígenos es de un 56%, pero tienen una especificidad de más de 97%. Si el test utiliza anticuerpos, se busca alta afinidad por la proteína diana, sin interferencia entre anticuerpos ni reactividad cruzada con otras proteínas o alta especificidad.<sup>7,10,17</sup>

Se pueden emplear LFA, ELISA o ambos, los cuales aportan rapidez y mayor sensibilidad, respectivamente<sup>7</sup>. También se pueden usar ensayos de inmunofluorescencia microfluídicos e inmunoensayos de cromatografía digital<sup>17</sup>. Otra prueba emplea anticuerpos frente a la proteína S viral inmovilizados en láminas de grafeno de FET y tiene alta sensibilidad. La detección por SPR y los sensores de fibra óptica suponen dos opciones más disponibles. Tanto SPR como FET son rápidos y sensibles; sin embargo, se suelen realizar en un laboratorio.<sup>7,10,32</sup>

Con todo lo anterior se puede apreciar el esfuerzo que se está haciendo por generar métodos diagnósticos en el lugar de asistencia, ya sea por mejorar técnicas existentes o por aumentar la oferta y adaptarse a las necesidades de cada nicho. En este sentido, las pruebas de antígenos son muy prometedoras<sup>10</sup>, pero es necesario incrementar la sensibilidad. Para ello, resultan atractivos los biosensores piezoeléctricos, que son simples, de bajo coste y muy sensibles y específicos.

## 2. Diseño de un biosensor piezoeléctrico

### 2.1. Piezoelectricidad

La piezoelectricidad se basa en un cambio de masa que se traduce en estrés mecánico sobre un material, generando voltaje. El dipolo eléctrico producido es lo que se conoce como piezoelectricidad. También puede ocurrir lo contrario, que aplicar un voltaje dé estrés mecánico. Los cristales anisotrópicos son materiales piezoeléctricos puesto que no tienen centro de simetría, como es el caso del fosfato de aluminio, nitrato de aluminio, óxido de zinc, cuarzo, tetrahidrato de tartrato, etc. También pueden actuar como materiales piezoeléctricos algunas biomoléculas como canales iónicos proteicos, colágeno o celulosa. Para el presente Trabajo Final de Grado (TFG) se ha elegido el cristal de cuarzo, que es ampliamente usado en biosensores piezoeléctricos, dando fiabilidad, y es de bajo coste con gran oferta en el mercado. Cuando se usa este cristal como sensor, se conoce como Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM).<sup>36-38</sup>

Un biosensor piezoeléctrico típico cuenta con una superficie piezoeléctrica como transductor a la que se acoplan dos electrodos, de forma que si se aplica voltaje alterno se generan oscilaciones mecánicas en el cristal y se puede medir la frecuencia de las oscilaciones conectando el cristal a un circuito de oscilación y un lector. En la superficie de los electrodos del cristal se inmoviliza un elemento de reconocimiento de origen biológico, de forma que cuando el analito de interés se una, el aumento de masa ( $\Delta m$ ) provocará una disminución de la frecuencia de oscilación ( $\Delta f$ ) de forma proporcional:<sup>37,38</sup>

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

$F_0$  es el modo fundamental de oscilación del cristal,  $A$  el área piezoeléctrica,  $\rho_q$  y  $\mu_q$  son la densidad y el módulo de cizalladura del cristal, donde el subíndice “q” se refiere al cristal de cuarzo. Esta ecuación es válida cuando es una película fina y rígida lo que está unido a los electrodos, pero en caso contrario hay que incluir en la ecuación el cambio de viscosidad del medio. Por ello, conviene mantener las condiciones ambientales lo más estables posible durante las medidas, por ejemplo, empleando el mismo tampón.<sup>38</sup>

### 2.2. Biodiana

Un amplio abanico de analitos puede ser detectado por biosensores piezoeléctricos, desde moléculas como citoquinas hasta microorganismos como bacterias. Cuanto mayor sea la masa del analito de interés, mayor será la bajada de frecuencia de oscilación. No obstante, analitos relativamente grandes, tal que una célula bacteriana, son detectados a través de elementos como una proteína de membrana, de forma que la bajada de frecuencia de oscilación se debería a la región próxima al elemento reconocido, mientras que la parte más alejada actuaría como medio viscoso.<sup>37-39</sup> Un virus como es el SARS-CoV-2 tendría un tamaño considerablemente menor, por lo que no debería dar este problema.

La glicoproteína de superficie (S) es la proteína más abundante en la superficie de SARS-CoV-2 y es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes generados en pacientes<sup>12</sup>, además se



utiliza como biomarcador en numerosos biosensores <sup>40</sup>. Por ello, se ha elegido la proteína S como diana en este trabajo.

Para analitos de baja masa es común buscar métodos para aumentar la masa del elemento reconocido por el biosensor, es decir, amplificar la señal y disminuir más la frecuencia de oscilación del cristal, aumentando así la sensibilidad de la prueba. Una forma de conseguirlo es formando un sándwich gracias a nanopartículas unidas a un elemento de reconocimiento. <sup>37-39,41</sup> La estrategia de tipo sándwich es usada en muchos tipos de biosensores, incluida la detección de SARS-CoV-2 con biosensores electroquímicos <sup>40</sup>, por ejemplo, lo que indica su utilidad. En concreto, una opción llamativa son nanoperlas magnéticas, que si son de 30 nm o menos tienen superparamagnetismo, de modo que no formarían agregados puesto que solo son magnéticas en campos magnéticos <sup>42</sup>.

Los pacientes de COVID-19 muestran generación de anticuerpos mayor y más temprana frente a la proteína de la nucleocápside (N), por lo que podría parecer una diana interesante a usar en reconocimiento simultáneo con la proteína S mediante las nanoperlas y aportar doble especificidad a la prueba <sup>41</sup>. No obstante, la proteína N se encuentra en el interior de las partículas víricas, por lo que la respuesta inmune, en lugar de estar tan dirigida hacia la neutralización de partículas víricas completas, lo está más hacia una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T. Aunque es una de las proteínas virales estructurales más expresadas y se puede usar para detección de antígenos virales, quizás no sería la más conveniente para plantear un formato de detección de partículas víricas completas tipo sándwich puesto que el elemento de biorreconocimiento que se emplee no podría acceder a la proteína. <sup>12,35,43,44</sup> Con todo esto, se ha decidido que como última capa del sándwich se emplearán nanoperlas magnéticas con elementos de reconocimiento frente a la proteína S también, pero preferiblemente frente a una región diferente de la que se unan los elementos de reconocimiento inmovilizados en el cristal de cuarzo (**Figura 3**).

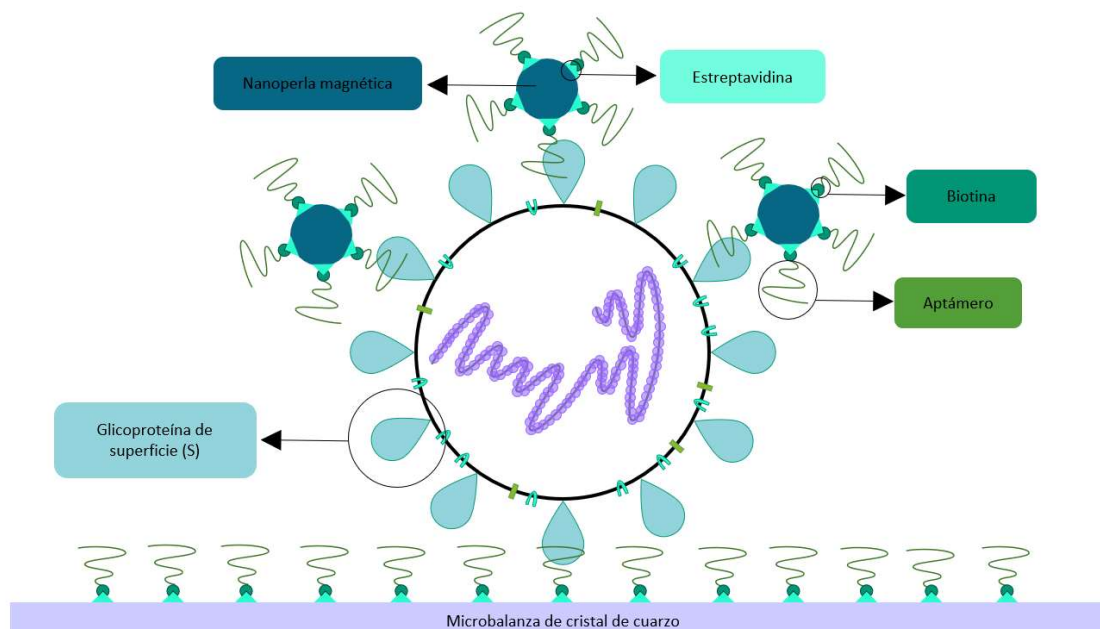
### 2.3. Biorreconocimiento

Los anticuerpos son ampliamente utilizados como elementos de reconocimiento, tanto en biosensores como en diversas técnicas, siendo relativamente fáciles de producir. No obstante, los aptámeros se han convertido en una competencia considerable.

Los aptámeros son biomoléculas como péptidos u oligonucleótidos, capaces de unirse con gran afinidad y especificidad a dianas moleculares o supramoleculares, incluyendo proteínas, gracias a la formación de estructuras secundarias. Entre sus aplicaciones se incluye neutralizar patógenos, dirigir fármacos hacia un tipo celular y servir como elementos de reconocimiento en biosensores (aptasensores). Los aptámeros de ácidos nucleicos son de síntesis sencilla y menor coste que anticuerpos monoclonales. También son más resistentes a las condiciones del medio como pH y temperatura y se pueden almacenar a largo plazo. Dicha resistencia permite que se pueda revertir la unión entre el aptámero y la diana sin dañar al primero, de forma que el biosensor es reutilizable decenas de veces. Además, el pequeño tamaño de los aptámeros permite que se puedan inmovilizar en superficies alcanzando gran densidad, que accedan a epítomos de difícil acceso por anticuerpos y que se puedan modificar químicamente. Una de estas modificaciones es la adición de biotina en el extremo 5' del oligonucleótido, de forma que

se puede inmovilizar en una superficie con estreptavidina, y es lo que se ha escogido para la presente propuesta (**Figura 3**).<sup>41,45–48</sup>

Los aptámeros de oligonucleótidos pueden ser de simple cadena de RNA o DNA. En este caso se ha decidido utilizar aptámeros de ssDNA por su facilidad de síntesis y por su mayor estabilidad frente al RNA.<sup>46</sup>



**Figura 3.** Modelo de la captura en formato sándwich de un virión de SARS-CoV-2. En la base se muestra la microbalanza de cristal de cuarzo con estreptavidina, la cual permite inmovilizar aptámeros biotinilados. Estos aptámeros reconocen una región de la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2, capturando partículas víricas que forman la segunda capa del sándwich. La tercera y última capa la componen nanopelotas magnéticas con aptámeros biotinilados, de nuevo inmovilizados por estreptavidina, reconociendo otra región de la proteína S.

Cabe destacar que se están comercializando algunas pruebas basadas en aptámeros frente a SARS-CoV-2, aunque con tecnologías diferentes a la tratada en el este trabajo. Uno de ellos es el ofrecido por Two-Photon Research, que se basa en la emisión de fluorescencia tras la unión de la diana al aptámero debido a un cambio conformacional que alejaría a un fluoróforo de un desactivador fluorescente o “quencher”<sup>49</sup>. Pinpoint Science, por su parte ha desarrollado una prueba que emplea nanoporos recubiertos de aptámeros por el interior y hace pasar una corriente por los poros, de forma que la unión de la diana reduce la corriente<sup>50</sup>.

## 2.4. Complementos electrónicos

Los biosensores piezoeléctricos necesitan de una interfaz electrónica, de las cuales existen múltiples opciones<sup>36</sup>. Para este TFG se ha elegido el sistema comercial Microbalanza de Cristal de Cuarzo QCM200 de Stanford Research Systems por la comodidad que ofrece<sup>51</sup>.

El sistema incluye tres cristales de cuarzo de 25.4 mm, frecuencia base de 5MHz y electrodos circulares a ambos lados, los cuales pueden ser de cromo/oro, titanio/oro o titanio/platino. También se incluye un soporte para el cristal; un oscilador electrónico; un medidor; y un

software para Windows. Otros complementos, incluyendo cristales adicionales, están disponibles en su página web.<sup>51</sup>

El sistema se puede usar por si solo leyendo la frecuencia desde el panel frontal del medidor o con un ordenador para obtener gráficas a tiempo real y almacenar los datos. Se indica que con este sistema se pueden detectar masas que van de microgramos a fracciones de nanogramos, incluso en medio líquido.<sup>51</sup>

### 3. Propuesta experimental para el desarrollo de un aptasensor piezoeléctrico

#### 3.1. Objetivos

El objetivo principal para el presente desarrollo experimental de un aptasensor piezoeléctrico es la selección e inmovilización de aptámeros en una microbalanza de cristal de cuarzo (QMC) y en nanopérlas magnéticas. Para ello, surgen una serie de objetivos parciales:

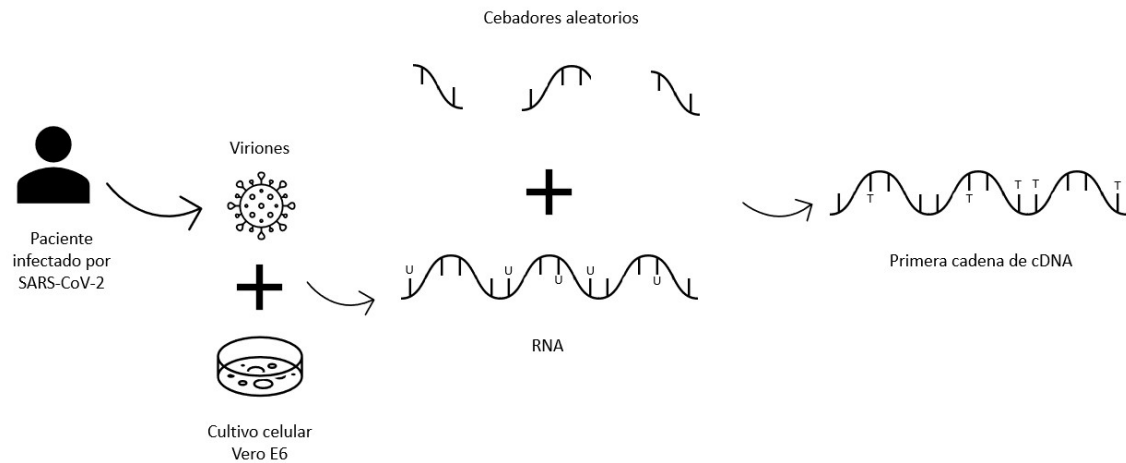
1. Clonación del gen de la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2.
2. Expresión de la proteína S y su purificación.
3. Selección de aptámeros por SELEX.
4. Inmovilización de aptámeros en QMC.
5. Inmovilización de aptámeros en nanopérlas magnéticas.

##### 3.1.1. Clonación del gen de la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2

La clonación del gen de la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2 consistiría en cultivar el virus en células adecuadas, aislar el RNA total, generar cDNA, amplificar el gen correspondiente a la proteína S viral e insertarlo en un vector.

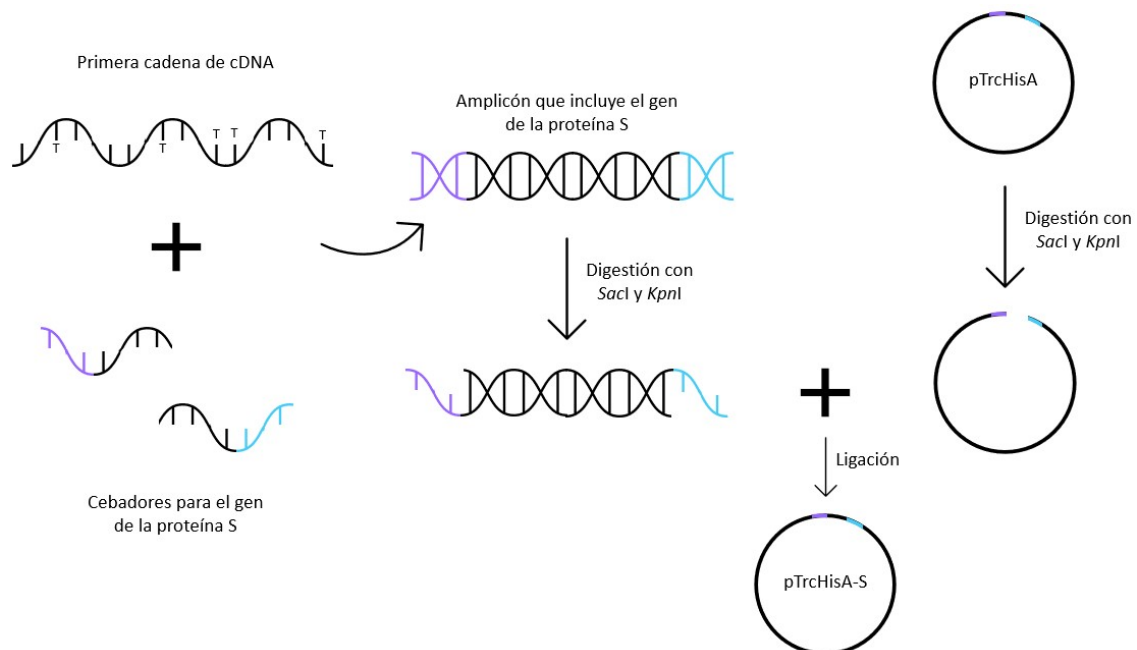
Para cultivar el virus se obtendría una muestra nasofaríngea de un paciente que haya sido testado positivamente para COVID-19 por RT-PCR y se usaría ésta para infectar células Vero E6, una línea celular de primates que se puede emplear para estudiar virus que infecten también a humanos. Las células se pueden mantener a 37 °C en medio mínimo esencial Eagle suplementado con penicilina-estreptomicina y un 10% de suero bovino fetal (FBS). La infección se realizaría a 37 °C en tampón fosfato salino (PBS) con 50 µg ml<sup>-1</sup> dietilaminoetil (DEAE)-dextrano y un 2% de FBS. Posteriormente se lavarían las células con PBS y volverían a mantenerse en el medio mínimo suplementado anterior. Las partículas víricas se obtendrían por centrifugación y se usaría el reactivo Trizol para la extracción de RNA. La concentración de RNA se puede determinar usando el sistema Qubit (Invitrogen). Todos los pasos que requieran trabajar con SARS-CoV-2 se realizarían en laboratorios de bioseguridad de nivel 3.<sup>52,53</sup>

La síntesis de la primera cadena de cDNA se podría realizar con la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen)<sup>54</sup>, dNTP Mix y cebadores aleatorios. El RNA complementario al cDNA sería eliminable por RNasa H. El proceso descrito hasta este punto se resume en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Obtención de cDNA partiendo de una muestra de un paciente infectado por SARS-CoV-2.

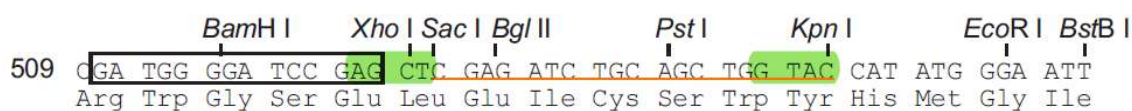
La primera cadena de cDNA contendría el gen de la glicoproteína de la espícula (S), y se puede emplear para clonar dicho gen en el vector pTrcHisA (Invitrogen), añadiendo así una etiqueta de polihistidina en el extremo N terminal de la proteína de interés <sup>54</sup>. Para ello se añadiría por PCR a ambos lados de la secuencia génica otra secuencia digerible por una o varias enzimas de restricción, y con ello generar extremos protuberantes que se puedan ligar al vector digerido con las mismas enzimas (**Figura 5**). Utilizar una sola enzima de restricción sería más sencillo, pero habría riesgo de recircularización del vector, inserción de la secuencia de interés en dos posibles direcciones o incluso inserciones en tándem, por lo que es preferible usar dos. Para elegir las enzimas de restricción a emplear se puede copiar la secuencia génica en formato FASTA (obtenida de GenBank) en el programa NEBcutter, visualizar qué enzimas no tienen ningún sitio de corte en la secuencia y elegir dos que sí tengan un sitio de corte en la secuencia del vector. En esta propuesta se han escogido las enzimas *SacI* y *KpnI*.



**Figura 5.** Amplificación del gen de la glicoproteína de superficie (S) e inserción en el vector pTrcHisA.

El diseño de los cebadores para amplificar el gen y poder insertarlo en un vector debe tener en cuenta que la fase de lectura del vector y de la secuencia génica concuerden <sup>55</sup>. La secuencia génica completa se muestra en el Anexo I. A continuación, se incluyen la secuencia de la región del vector donde se encuentran los sitios de corte para *SacI* y *KpnI* dentro del sitio de clonación múltiple (MCS) (**Figura 6**), el principio y el final de la secuencia del gen, los cebadores diseñados para amplificar el gen y el amplicón generado por PCR con estos cebadores.

En morado se muestran los nucleótidos seleccionados de cada extremo de la secuencia génica para el diseño de cebadores. En color verde se indican los nucleótidos que formarán el extremo protuberante tras la restricción. Además de los nucleótidos necesarios para el reconocimiento del sitio de restricción, se debería añadir una serie de nucleótidos corta (últimos seis nucleótidos hacia 5' en negro de los cebadores en este caso) debido a que estas enzimas de restricción son endonucleasas. Se podría contemplar la opción de añadir o eliminar algún nucleótido a la secuencia de los cebadores para optimizarlos.



**Figura 6.** Extracto modificado de la secuencia del vector *pTrcHisA* <sup>55</sup>. Se muestran los puntos de corte de una serie de enzimas de restricción. Resaltadas en verde se han indicado las regiones que formarían extremos protuberantes y, subrayada en naranja, la región del vector que sería sustituida por el amplicón de interés.

Secuencia del gen S: Número de acceso NC\_045512.2 <sup>56</sup>

5'-ATG TTT GTT TTT CTT GTT TTA TTG CCA CTA GTC TCT AGT CAG TGT GTT AAT CTT ACA ACC  
 AGA ACT CAA T ... TCT GAG CCA GTG CTC AAA GGA GTC AAA TTA CAT TAC ACA TAA-3'

Cebadores para amplificar el gen S:

SF (cebador directo): 5'-GGTACTGAGCTCATGTTTGTTCCTTGTT-3'

SR (cebador reverso): 5'-GGTACTGTACCTTATGTGTAATGTAATT-3'

Amplicón resultante:

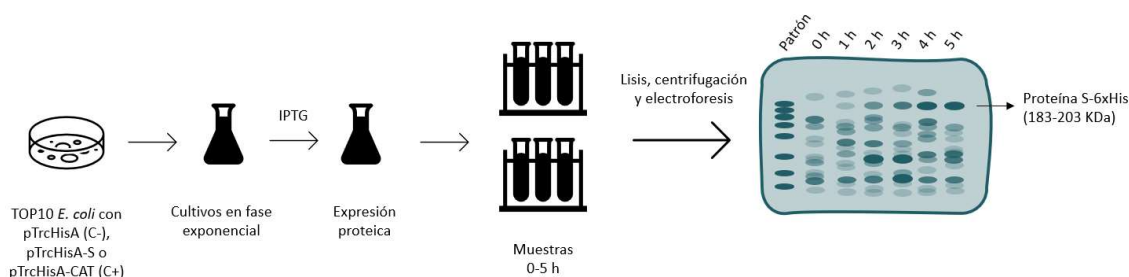
5'-GGT ACT GAG CTC ATG TTT GTT TTT CTT GTT TTA TTG CCA CTA GTC TCT AGT CAG TGT GTT  
 AAT CTT ACA ACC AGA ACT CAA T ... TCT GAG CCA GTG CTC AAA GGA GTC AAA TTA CAT TAC ACA  
 TAA GGT ACC AGT ACC -3'

Con estos cebadores y la DNA polimerasa LA Taq (TaKaRa) <sup>52</sup> se amplificaría el gen a partir del cDNA tratado con RNasa H. Los productos de PCR se purificarían con el kit mi-PCR (Metabion) y se digerirían con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI*. La DNA polimerasa LA Taq inserta un dATP en los extremo 3' del amplicón, pero la digestión permite que este factor no influya en la clonación. Por otro lado, el vector *pTrcHisA* también se digeriría con *SacI* y *KpnI*. Posteriormente, los amplicones y vectores digeridos se ligarían gracias a los extremos cohesivos generados y la acción de la T4 DNA ligasa.

Una vez insertado el gen en vectores pTrcHisA, estos se podrían emplear para transformar por choque térmico células quimiocompetentes de la cepa TOP10 de *Escherichia coli* o en otra cepa que también sea deficiente para recombinación (*recA*) y endonucleasa A (*endA*). Como control negativo del proceso de transformación se podría realizar en paralelo el mismo, pero sin incluir vector. Como control negativo para la posterior expresión de la proteína sería necesario realizar la transformación con vector sin inserto, también en paralelo. El gen de resistencia a ampicilina proporcionado por el vector permite la selección de las células transformadas.<sup>55</sup> Para comprobar la presencia del inserto en células recombinantes se haría una PCR con los cebadores diseñados y la DNA polimerasa LA Taq a partir de una colonia aislada.

### 3.1.2. Expresión de la proteína S y su purificación

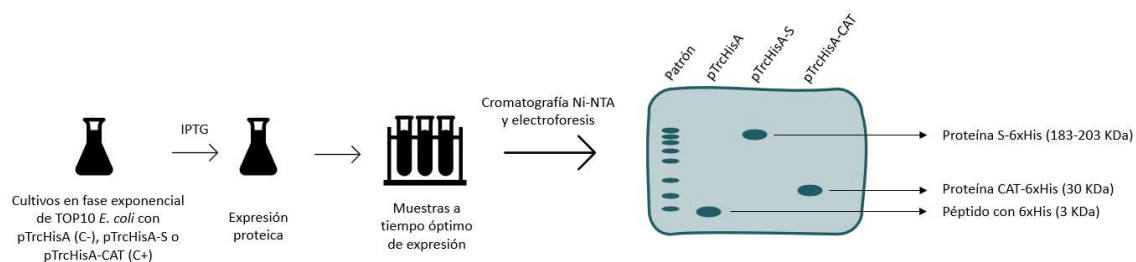
La expresión proteica se realizaría en paralelo para una colonia recombinante con inserto, una colonia recombinante sin inserto como control negativo y una colonia con el vector pTrcHisCAT como control positivo (contiene el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)). La expresión se induciría en cultivos en fase exponencial con isopropil- $\beta$ -D-1- tiogalactopiranosido (IPTG) y se recogerían muestras cada hora durante 5 horas para determinar el tiempo óptimo de recogida, con tiempo cero antes de añadir IPTG. Las células se recogerían por centrifugación y se lisarían mediante congelación con nitrógeno líquido y descongelado a 42 °C. Por centrifugación se recogerían en el pellet las proteínas insolubles y en el sobrenadante las proteínas solubles. Estas muestras se analizarían por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% con posterior tinción con azul Coomassie y se compararían con el control negativo y el control positivo (**Figura 7**).<sup>55</sup>



**Figura 7.** Determinación del tiempo óptimo de expresión de la proteína S recombinante. Se muestra un gel hipotético de poliacrilamida-SDS al 10% teñido para pTrcHisA-S.

El péptido de fusión en el extremo N terminal proporcionado por el vector es de 3 kDa<sup>55</sup>. La proteína S tiene 1273 aminoácidos y pesa 180-200 KDa<sup>57</sup>, por lo que habría que buscar en el gel una banda correspondiente a unos 183-203 KDa (**Figura 7**). La proteína CAT tendrá 30 KDa.

La proteína S se purificaría a partir de las muestras a tiempo de expresión óptimo por cromatografía de afinidad en agarosa Ni-NTA<sup>54</sup>. Los volúmenes recogidos por lavados y elución se analizarían por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% con posterior tinción con azul Coomassie, buscando una única banda de tamaño correspondiente a la proteína recombinante de interés (**Figura 8**). La concentración proteica en los eluidos se determinaría con el kit de ensayo proteico II (Bio-Rad)<sup>54</sup>. La proteína de fusión expresada por el vector sin inserto se podría purificar también y usarse como control negativo en la selección de aptámeros.



**Figura 8.** Purificación proteica. Se ilustra un gel hipotético de poliacrilamida-SDS al 10% teñido, esperando una banda para cada proteína o péptido.

Cabe destacar que la proteína S es una proteína integral de membrana que forma trímeros en los viriones. La fracción que se inserta en la membrana es relativamente pequeña, pero conviene considerar la posibilidad de que se formen agregados o que las proteínas tiendan a formar trímeros u otros posibles artefactos. Para tratar de evitarlo, se podría clonar únicamente el ectodominio, que es la parte que se pretende reconocer con el biosensor, aunque requeriría un diseño de cebadores más laborioso puesto que habría que tener en cuenta la estructura tridimensional de la proteína.<sup>58,59</sup>

### 3.1.3. Selección de aptámeros por SELEX

Los aptámeros se seleccionan mediante Evolución Sistemática de Ligandos por enriquecimiento EXponencial (SELEX) a partir de bibliotecas de ácidos nucleicos sintetizadas in vitro. Los aptámeros finales oscilan entre 15 y 70 mers de longitud. Existen diferentes aproximaciones para la elaboración de la biblioteca, donde la más sencilla y empleada es que los oligos cuenten con dos sitios de unión de cebadores en los extremos de unos 20 nucleótidos y una región aleatorizada en el centro de 30-50 nucleótidos. Un ejemplo de librería se ilustra en la **Figura 9**<sup>46,48,60</sup>

Type	Starting Libraries and Primers (5'→3')
	Classical SELEX
DNA	Library: GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA-N40-TTCGACAGGAGGCTCACAAACAGGC 5'-primer: GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA 3'-primer: GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA

**Figura 9.** Extracto de Vorobyeva et al (2018). Se muestra un ejemplo de secuencias de sitios de unión de cebadores. N40 hace referencia a la región central aleatorizada de los aptámeros, que cuenta con 40 nucleótidos en este caso.

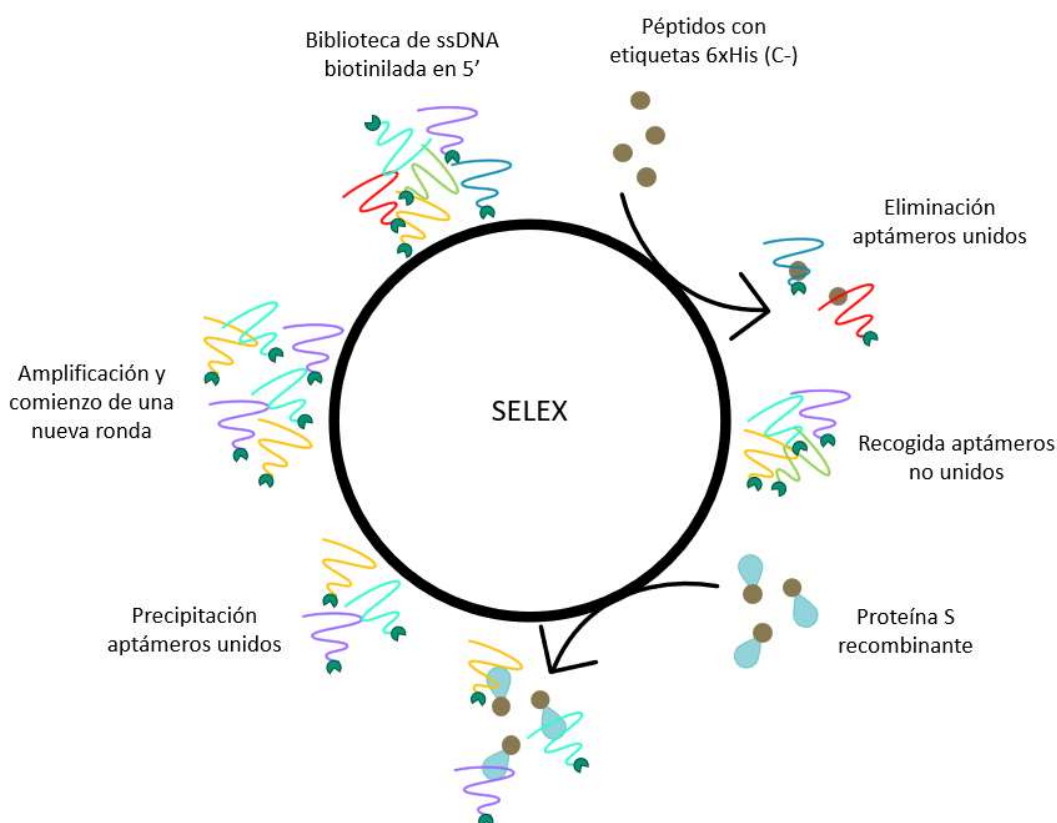
La biblioteca de ssDNA se podría amplificar por PCR con la DNA polimerasa Pfu (Promega), que es de alta fidelidad. El cebador directo estaría conjugado con biotina en el extremo 5'<sup>61</sup> y el reverso fosforilado en 5'<sup>62</sup>. Tras la amplificación, se incubaría el DNA de doble cadena (dsDNA) con  $\lambda$ -exonucleasa, se purificaría el ssDNA biotinilado con sefarsa con estreptavidina y se mediría su concentración con Qubit.

Los aptámeros de ssDNA se calentarían a 90-95 °C y se enfriarían en hielo para que adoptasen su estructura tridimensional característica<sup>61,62</sup>. Se incubarían los aptámeros con el péptido de fusión generado usando el vector pTrcHisA sin inserto en tampón de unión (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ditiotretitol (DTT) y 1% seroalbúmina bovina (BSA))<sup>62</sup> y se retendrían los complejos formados por cromatografía de afinidad en agarosa Ni-



NTA. La fracción retenida sería eliminada como control, evitando los aptámeros que se uniesen al péptido de fusión de la proteína recombinante y los que tuviesen afinidad por la columna. Otro posible control sería producir la proteína S de SARS-CoV de la misma manera que se ha propuesto generar la de SARS-CoV-2 y descartar los aptámeros que se uniesen, aunque habría que valorar si la pérdida de posibles aptámeros superaría la ganancia en especificidad.

La fracción lavada con el resto de los aptámeros se incubaría con proteína S etiquetada en tampón de unión, se realizaría otra cromatografía de afinidad en agarosa Ni-NTA y a partir del eluido final se precipitaría el ssDNA mediante tratamiento con fenol y precipitación con etanol<sup>62</sup>. El ssDNA obtenido se amplificaría y se empezaría otra ronda de selección hasta completar unas 10 rondas (**Figura 10**)<sup>54,61,62</sup>.



**Figura 10.** Selección de aptámeros de ssDNA biotinilados en el extremo 5' por SELEX frente a la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2.

En cada ronda de selección se aplicarían condiciones más astringentes como reducir la concentración de proteína etiquetada<sup>61,62</sup> y la concentración de ssDNA<sup>61</sup> para retener a los aptámeros con mayor afinidad de unión por la proteína.

Terminado el proceso de SELEX, los aptámeros restantes se volverían a amplificar y se clonarían para secuenciarlos<sup>62</sup>. Para la clonación se podrían diseñar cebadores de forma análoga a los diseñados para la amplificación del gen S puesto que se conocería la secuencia de los sitios de unión de cebadores de los aptámeros. Con dichos cebadores se amplificarían los aptámeros y se purificarían con el kit mi-PCR. Los amplicones y el vector pTrcHisA se digerirían con *SacI* y *KpnI* y se realizaría la ligación de amplicones y vector con T4 DNA ligasa. Se transformarían por choque térmico células quimiocompetentes de la cepa TOP10 de *E. coli* y se tomarían colonias



aisladas transformantes para amplificar la región de interés con los mismos cebadores diseñados para la clonación. El DNA amplificado se purificaría con el kit mi-PCR y se enviaría al Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, que ofrece el servicio de marcaje y secuenciación Sanger de DNA.

Obtenida la secuencia, se podría predecir la estructura secundaria adoptada por cada aptámero con el programa mFold y estudiar cómo afectaría la eliminación de ciertas bases, ya que no todas son esenciales y se reducirían costes de producción e impedimentos estéricos. Para determinar la interacción entre los aptámeros obtenidos y la proteína se podrían realizar simulaciones de acoplamiento y de dinámica molecular (MDS).<sup>61-63</sup> Con ello sería posible seleccionar los dos aptámeros a emplear para el aptasensor piezoeléctrico. Uno de ellos podría dirigirse hacia el dominio de unión al receptor de la proteína S y el otro hacia la subunidad S1 o S2. Sería interesante incluso buscar aptámeros que distinguiesen variantes de SARS-CoV-2.

Si se obtuviesen varios aptámeros candidatos frente a la misma diana, se elegiría el más afín. La medida de afinidad por la proteína se podría realizar por ELISA. Se emplearía proteína S etiquetada cubriendo pocillos con níquel, se lavaría con PBST (PBS con 0.1 % de Tween-20) y se bloquearía con 5 % de BSA en PBST. Los aptámeros biotinilados en 5' se incubarán a diferentes concentraciones y se detectarían los complejos formados con estreptavidina conjugada con la peroxidasa del rábano. Para la reacción coloreada se emplearía solución O-fenilendiamina y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se mediría la absorbancia a 492 nm.<sup>62</sup>

#### 3.1.4. Inmovilización de aptámeros en QMC

La inmovilización de los aptámeros en las microbalanzas de cristal de cuarzo se podría llevar a cabo con la superficie del cristal recubierta de estreptavidina unida a dextrano carboxilado. El dextrano es hidrofílico y sin carga, de modo que prácticamente no establece interacciones inespecíficas con proteínas, además de que las matrices de dextrano ofrecen buena accesibilidad a los ligandos que tenga inmovilizados.<sup>64</sup>

El procesamiento de los cristales comenzaría con un baño de una solución alcohólica de 11-mercaptoundecanol 1 mM, se lavaría con etanol y agua y se sonificaría para eliminar el exceso de tiol. Se daría un baño con epiclorohidrina 600 mM en NaOH 400 mM y bis-2-metoxietil éter 400 mM en ratio 1:1. Se volvería a lavar con etanol y agua, se incubaría el cristal en dextrano básico (0.3 g ml<sup>-1</sup> en NaOH 100 mM) y se lavaría con agua. Se funcionalizaría el cristal con ácido bromoacético 1 M en NaOH 2 M para añadir un grupo carboximetilo y se lavaría de nuevo con agua. Se activaría el cristal con una mezcla de N-hidroxisuccinimida 50 mM y EDAC 200 mM en agua, se retiraría la mezcla y se añadiría estreptavidina 200 µg ml<sup>-1</sup> en tampón de acetato 100 mM pH 5. Se terminaría bloqueando los sitios reactivos residuales con clorhidrato de etanolamina 1M, pH 8.6.<sup>64</sup> A continuación, los aptámeros biotinilados se incubarán en PBS sobre el cristal con estreptavidina para inmovilizarlos. Previamente, los aptámeros se habrán tratado térmicamente desnaturalizando a 90-95 °C y enfriando en hielo. Se podría considerar un bloqueo adicional con D-biotina.

Cuando se lleven a cabo medidas con el biosensor, la unión entre aptámeros y proteína diana se desharía con HCl 1 mM como solución de regeneración.<sup>64</sup>

### 3.1.5. Inmovilización de aptámeros en nanopelotas magnéticas

Para la segunda capa del sándwich del biosensor se usarían nanopartículas de óxido de hierro con recubrimiento funcional de estreptavidina de 30 nm (Ocean NanoTech). Las nanopartículas se incubarían en agitación en PBS con los aptámeros biotinilados. Después se bloquearían los sitios de unión inespecíficos de las nanopartículas con D-biotina 0.5 mg ml<sup>-1</sup>, se aplicaría un campo magnético de 1.2 T para recoger los complejos y éstos se resuspenderían en PBS.<sup>42</sup>

## 4. Validación del método como prueba diagnóstica

### 4.1. Ensayo piezoeléctrico

Construido el aptasensor piezoeléctrico, las mediciones de analitos se llevarían a cabo de la siguiente manera. Se mediría la frecuencia basal de oscilación con PBS y se incubaría la muestra de interés diluida en PBS, la cual correspondería a exudados nasofaríngeos en ensayos diagnósticos. Entonces se realizaría un lavado con PBS para eliminar las moléculas que pudiera haber en la muestra y que no sean reconocidas por los aptámeros. Después se incubaría el biosensor con las nanopelotas magnéticas conjugadas con aptámeros, de nuevo en PBS, y se realizaría un último lavado dejando PBS en la plataforma. Los tiempos de incubación son variables de acuerdo con la literatura, pero pueden entrar en el rango de 30 min o 1 hora<sup>41,42</sup>. Sería conveniente tratar de optimizar los tiempos de incubación para hacer la prueba todavía más atractiva, es decir, intentar ganar rapidez sin perder sensibilidad. La propuesta contempla una única medida para cada muestra al aspirar a ultrasensibilidad analítica, aunque se podría considerar realizar dos mediciones para minimizar errores. En ese caso lo ideal sería usar el mismo biosensor, pero requeriría invertir el doble de tiempo, por lo que quizás se podrían usar dos biosensores en paralelo.

La regeneración del sistema se realizaría por incubación con HCl 1 mM durante 1 min<sup>64</sup> y lavado posterior con PBS, quedando listo para una nueva medición. El proceso podría repetirse decenas de veces<sup>41</sup>; no obstante, el número exacto de posibles repeticiones se debería determinar empíricamente. Se ha descrito el uso de aptámeros en hasta 50 ciclos de cromatografía, probando su resistencia<sup>65</sup>. El PBS es un tampón relativamente suave, pero podría preocupar el efecto corrosivo del HCl, por ejemplo, sobre los electrodos<sup>66</sup> o sobre el cuarzo. Se podría considerar emplear HCl a menor concentración para minimizar el daño o usar otra solución para regeneración. En este TFG, se va a considerar una vida útil de los cristales de 20 repeticiones, a falta de una determinación experimental.

Los volúmenes necesarios a lo largo del ensayo también habría que optimizarlos, aunque 0.2 ml parece a priori una cantidad apropiada para las dimensiones del sensor. Para la medición de la frecuencia basal y los tres lavados, incluyendo el de la regeneración, se emplearían entonces 0.8 ml de PBS por ensayo. Si la muestra de interés se homogeneizase en 0.5 ml de PBS, aunque se empleasen 0.2 ml de esa mezcla, el PBS usado por ensayo ascendería a 1.3 ml. Las nanopelotas también estarían diluidas en PBS y se emplearía de nuevo 0.2 ml, pero estarían preparadas aparte con anterioridad.

## 4.2. Calibrado

Realizar una curva de calibrado es necesario para establecer el límite de detección de la prueba y, con ello, su sensibilidad analítica <sup>39</sup>.

Para empezar, se podría realizar una curva de calibrado registrando la variación de la frecuencia de oscilación a diferentes concentraciones de la misma proteína S que se emplee para la selección de aptámeros. Se podrían realizar dos curvas, una de ellas empleando las nanopérlas magnéticas y otra sin ellas para determinar la repercusión que tienen sobre la sensibilidad. No obstante, lo ideal sería realizar un calibrado a diferentes concentraciones de partículas víricas, aunque sería más laborioso.

## 4.3. Sensibilidad y especificidad clínicas y razón de verosimilitud

Si el aptasensor piezoeléctrico se ha desarrollado correctamente, esperaríamos una especificidad analítica alta. Se busca que la sensibilidad analítica también sea lo más alta posible, mayor que la de test de antígenos tradicionales e, idealmente, equiparable con la RT-PCR. Por ello, se tomaría una muestra poblacional a la que se hiciese una RT-PCR que permitiese clasificar a los individuos como infectados o sanos. Con el aptasensor piezoeléctrico se clasificarían los individuos como positivos o negativos.

La **Tabla 1** recoge las distintas posibilidades que se pueden obtener con la prueba, definiendo los pacientes que den positivo y estén infectados como verdaderos positivos (TP), los positivos que en realidad estén sanos como falsos positivos (FP), los pacientes negativos que en realidad estén infectados como falsos negativos (FN) y los negativos que estén sanos como verdaderos negativos (TN). <sup>67</sup>

<b>Tabla 1.</b> Posibles resultados empleando una prueba diagnóstica			
Resultado	Infectados	Sanos	Total
Positivo	TP	FP	TP + FP
Negativo	FN	TN	FN + TN
Total	TP + FN	FP + TN	TP + FP + FN + TN

Elaborada la **Tabla 1**, se determinarían la sensibilidad y especificidad clínicas. La sensibilidad clínica se refiere al porcentaje de verdaderos positivos dentro del total de infectados <sup>67</sup>:

$$\text{Sensibilidad clínica} = 100 \cdot \frac{TP}{TP + FN}$$

Por su parte, la especificidad clínica viene dada por el porcentaje de verdaderos negativos del total de sanos <sup>67</sup>:

$$\text{Especificidad clínica} = 100 \cdot \frac{TN}{TN + FP}$$

A raíz de la sensibilidad y especificidad clínicas también se calcularía la razón de verosimilitud (LR), empleada en decisiones clínicas e independiente de la prevalencia de la

enfermedad. Se refiere al ratio de probabilidad de que se dé un resultado en pacientes infectados respecto a sanos. Se definen LR+ y LR- de la siguiente manera <sup>67,68</sup>:

$$LR+ = \frac{\text{sensibilidad clínica}}{1 - \text{especificidad clínica}}$$

$$LR- = \frac{1 - \text{sensibilidad clínica}}{\text{especificidad clínica}}$$

Cuanto más alto sea el LR+, más cercanas a 1 serán la sensibilidad y la especificidad, que es lo que se busca. De forma similar, cuanto más bajo sea el LR-, más cercanas a 1 serán la sensibilidad y la especificidad. Por tanto, se puede emplear tanto el LR+ o el LR- para condensar la sensibilidad y especificidad clínicas de una prueba diagnóstica. <sup>67</sup>

#### 4.4. Valor predictivo positivo y negativo

El valor predictivo positivo (PPV) indica la probabilidad de que un resultado positivo corresponda a un infectado, es decir, el porcentaje de verdaderos positivos dentro del total de positivos <sup>67</sup>:

$$PPV = 100 \cdot \frac{TP}{TP + FP}$$

Por otro lado, el valor predictivo negativo (NPV) muestra la probabilidad de que un resultado negativo corresponda a un individuo sano, o lo que es lo mismo, el porcentaje de verdaderos negativos dentro del total de negativos <sup>67</sup>:

$$NPV = 100 \cdot \frac{TN}{TN + FN}$$

En estos cálculos es donde la prevalencia de la enfermedad tendrá un impacto considerable. Con baja prevalencia de la enfermedad habrá muchas más personas sanas que infectadas, por lo que es probable que haya más falsos positivos que verdaderos positivos y tiende a aumentar la probabilidad de falsos positivos, disminuyendo el PPV. De forma similar, habrá muchos más verdaderos negativos que falsos negativos, aumentando el NPV. <sup>8,14,67</sup> Por ello, con prevalencias bajas, es recomendable realizar la prueba a personas con sospecha de estar infectadas, por ejemplo, personas con síntomas o contacto directo con infectados.

#### 4.5. Curva ROC

La calidad de una prueba diagnóstica se puede determinar con una curva ROC cuantificando el área bajo la curva. En una curva ROC se representa la sensibilidad clínica frente a 1-especificidad clínica, es decir, el porcentaje de verdaderos positivos dentro de los infectados frente al porcentaje de falsos positivos dentro de las personas sanas. Cuanto mayor sea el área, mayor utilidad clínica tiene la prueba. <sup>67</sup>

Hay que tener en cuenta que los infectados y los sanos serán clasificados como positivos o negativos según el valor umbral que se decida establecer en la prueba. Cada valor de la prueba

de la muestra con la que se trabaje se usaría como umbral y se calcularía para cada umbral la sensibilidad clínica y 1-especificidad clínica, obteniendo tantos puntos para la curva ROC como tamaño tenía la muestra del estudio. De la curva ROC resultante se podría obtener el umbral óptimo para la prueba.<sup>67</sup>

## 5. Aptazovid, primera prueba diagnóstica de Aptazogen

### 5.1. Acerca de Aptazogen. Misión, visión y valores

Aptazogen nace en la primavera de 2021 en el contexto de la pandemia de COVID-19 con la misión de proporcionar un diagnóstico sensible, específico y a pie de cama del paciente. El auge de los biosensores como técnicas diagnósticas y la necesidad de superar las limitaciones de las pruebas existentes han llevado a Aptazogen a focalizarse en aptasensores piezoeléctricos. Aptazovid es la prueba diagnóstica de detección de SARS-CoV-2 desarrollada en el presente TFG y la primera de Aptazogen.

En Aptazogen creemos que el diagnóstico debe ser asequible y sostenible, desarrollando sistemas reutilizables. Además, Aptazogen fomenta la innovación y la inserción laboral juvenil al contar con un potente departamento de I + D + I (Investigación + Desarrollo + Innovación).

### 5.2. Balance de costes

#### 5.2.1. Puesta en marcha de Aptazogen

En la **Tabla I** del Anexo II se recopila el coste estimado de la inversión en reactivos, maquinaria y demás instrumental. En la búsqueda de precios de venta se ha recurrido a casas comerciales como Thermo Fisher Scientific o Sigma-Aldrich, donde la mayoría de los precios se refieren a la cantidad mínima adquirible de los reactivos. Se solicitó un presupuesto para la adquisición de una biblioteca de ssDNA a la casa comercial Arbor biosciences, pero no ha sido posible obtener uno de esta ni otras casas comerciales por cuestiones burocráticas.

La suma asciende a cerca de 57000 €, por lo que el presupuesto global se podría estimar en 70000 € para albergar material no mencionado o necesidad de adquirir varias unidades de un producto. Para simplificar, no se han tenido en cuenta gastos en instalaciones y mano de obra.

#### 5.2.2. Coste de la prueba diagnóstica

Considerando 20 ensayos o medidas por cristal de cuarzo, se ha estimado el coste de los reactivos de la producción de aptámeros, el tratamiento previo de un cristal, la inmovilización de aptámeros en el cristal y en nanopérlas magnéticas, y el gasto de PBS y HCl. El desglose se muestra en la **Tabla II** del Anexo II.

Se ha considerado que se realizarían dos reacciones de PCR por cada 20 ensayos, una para los aptámeros inmovilizados en el cristal y otra para los inmovilizados en nanopérlas. Se

prepararía de una vez cantidad suficiente de nanopelotas conjugadas para los 20 ensayos. En la bibliografía se empleaban 75  $\mu\text{l}$  a 0.5  $\text{mg ml}^{-1}$  por cada ensayo, pero aquí se ha decidido que se probaría con 10  $\mu\text{l}$  a 1  $\text{mg ml}^{-1}$  para reducir gastos. De D-biotina se emplearían 0.5  $\text{ml}$  a 0.5  $\text{mg ml}^{-1}$  por ensayo. El gasto de DNA polimerasa Pfu (Promega), dNTPs y cebadores se ha estimado a partir del manual de la casa comercial de la polimerasa asumiendo volúmenes de reacción de PCR de 50  $\mu\text{l}$ . El gasto de  $\lambda$ -exonucleasa se ha estimado a partir del manual de la casa comercial.

Para el tratamiento de los cristales se ha asumido un consumo de 0.5  $\text{ml}$  de 11-mercaptoundecanol, epíclorohidrina, bis-2-metoxietil éter, dextrano básico y ácido bromoacético, y 0.2  $\text{ml}$  de N-hidroxisuccinimida, EDAC, estreptavidina y clorhidrato de etanolamina, todos a las concentraciones indicadas en la bibliografía. Para el cálculo del coste se ha tenido en cuenta el peso molecular del compuesto o la concentración a la que se comercialice.

Con todo lo anterior, el coste de la realización de 20 ensayos ascendería a unos 90 €, a falta de determinar los costes fijos de la empresa.

### 5.3. Aptazovid. Líneas principales de negocio

#### 5.3.1. Comercialización del kit Aptazovid

Para cumplir con el objetivo de proporcionar un diagnóstico a pie de cama o point-of-care, se ofertaría un kit para 20 mediciones que incluiría una microbalanza con aptámeros inmovilizados y cantidad suficiente de PBS, nanopelotas conjugadas con aptámeros y HCl 1  $\text{mM}$ . El kit se comercializaría por 120 €, a falta de un estudio de mercado y de determinar gastos fijos, de forma que cada medición saldría a 6 €.

El nicho de mercado sería la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública de la Generalitat Valenciana, que sería la que se encargaría de distribuir el producto en sus centros sanitarios, incluyendo hospitales y centros de salud, entre otros. Sería necesario adquirir el complemento electrónico por separado, pero es relativamente barato y resultaría muy atractivo puesto que no se perdería tiempo en diagnóstico mandando la prueba a un laboratorio. Así, sin traslado se evitarían fallos en la identificación de la muestra, su extravío o que se echase a perder.

#### 5.3.2. Servicio de diagnóstico Aptazovid

Ya sea como requerimiento para actividades como vuelos en avión o por tranquilidad a la hora de visitar seres queridos, muchas personas optan por empresas privadas para realizarse una prueba diagnóstica de infección por SARS-CoV-2. Las opciones más populares son las pruebas de RT-PCR y las pruebas de antígenos. Las primeras son más fiables, pero su precio tiende a superar los 100 €<sup>69</sup>. Las segundas son más rápidas y pueden rondar los 25-45 €<sup>70,71</sup>, pero suelen ser menos fiables. Aptazovid combinaría gran fiabilidad, rapidez y bajo coste.

En este caso, el nicho de mercado es la población general, empezando por el área metropolitana de Valencia y alrededores. La empresa tendría uno o varios laboratorios

localizados en puntos estratégicos como el centro de la ciudad de Valencia, proporcionando accesibilidad.

Cada medición le saldría a la empresa por cerca de 5 € y se ofertaría el servicio de diagnóstico por 10 €, de nuevo a falta de un balance de costes más preciso y un estudio de mercado.

#### 5.4. Estrategias a corto, medio y largo plazo

A corto plazo se optaría por llevar a cabo las líneas de negocio planteadas en el apartado 5.3, mientras que a medio plazo se trataría de ampliar el área de actuación. En el caso de la comercialización del producto, se buscaría alcanzar Consejerías de Sanidad de otras Comunidades Autónomas, y, para el servicio de diagnóstico, extender la oferta a otros puntos de la Comunidad Valenciana como Castellón o Alicante. A medio plazo también se intentaría generar aptámeros frente a otras variantes de SARS-CoV-2.

A largo plazo se trataría de desarrollar aptámeros frente a otros patógenos con una aproximación similar a la empleada en este TFG.

### 6. Conclusiones y consideraciones futuras

Tras una revisión del estado de la técnica de la detección de SARS-CoV-2, se ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos sensibles, específicos, rápidos y, preferiblemente, a pie de cama o point-of-care. Por ello, en el presente TFG se ha realizado una propuesta para el desarrollo de un aptasensor piezoeléctrico. El sensor emplearía un formato sándwich para el reconocimiento y captura de SARS-CoV-2 mediante aptámeros de ssDNA dirigidos hacia la proteína S viral. Se ha precisado el procedimiento experimental para la selección de aptámeros y construcción del biosensor, además de la validación y comercialización de la técnica.

Por último, en caso de que se llevase a cabo la propuesta sería conveniente:

- Optimizar el procedimiento experimental para el diseño e inmovilización de aptámeros, especialmente con relación a cantidades de reactivos y tiempos de realización de cada paso experimental.
- Determinar la vida útil de los cristales de cuarzo con aptámeros inmovilizados y, en función de ello, tratar de optimizar todavía más la construcción del biosensor para abaratar costes de producción.
- Optimizar los tiempos del ensayo piezoeléctrico sin perder sensibilidad.
- Determinar el número de mediciones a partir de una misma muestra para minimizar errores.
- Determinar los costes reales de la puesta en marcha de la empresa y de la prueba diagnóstica teniendo en cuenta instalaciones y personal.
- Cultivar distintas variantes de SARS-CoV-2 para tratar de generar aptámeros específicos de variante.

## 7. Bibliografía

1. MacKenzie, J. S. & Smith, D. W. COVID-19: A novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: What we know and what we don't. *Microbiol. Aust.* **41**, 45–50 (2020).
2. Shi, Z. & Hu, Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res.* **133**, 74–87 (2008).
3. Docea, A. O. *et al.* A new threat from an old enemy: Re-emergence of coronavirus (Review). *International Journal of Molecular Medicine* vol. 45 1631–1643 (2020).
4. Xie, M. & Chen, Q. Insight into 2019 novel coronavirus — An updated interim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV. *International Journal of Infectious Diseases* vol. 94 119–124 (2020).
5. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* **5**, 562–569 (2020).
6. Tang, E. W., Bobenchik, A. M. & Lu, S. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): A General Review. (2020) doi:10.1128/JVI.01756-13.
7. Yüce, M., Filiztekin, E. & Özkaya, K. G. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosens. Bioelectron.* **172**, 112752 (2021).
8. Chau, C. H., Strope, J. D. & Figg, W. D. COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy* **40**, 857–868 (2020).
9. Li, C., Yang, Y. & Ren, L. Genetic evolution analysis of 2019 novel coronavirus and coronavirus from other species. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 82 104285 (2020).
10. Taleghani, N. & Taghipour, F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosensors and Bioelectronics* vol. 174 (2021).
11. Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G. & Schinazi, R. F. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology* vol. 74 168–184 (2021).
12. Ye, Q., West, A. M. V., Silletti, S. & Corbett, K. D. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Sci.* **29**, 1890–1901 (2020).
13. Islam, K. U. & Iqbal, J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10 (2020).
14. Carpenter, C. R., Mudd, P. A., West, C. P., Wilber, E. & Wilber, S. T. Diagnosing COVID-19 in the Emergency Department: A Scoping Review of Clinical Examinations, Laboratory Tests, Imaging Accuracy, and Biases. *Acad. Emerg. Med.* **27**, 653–670 (2020).
15. Ministerio de Ciencia e Innovación; Ministerio de Sanidad; Consejo Interterritorial e Instituto de Salud Carlos III. *ESTUDIO ENE-COVID: CUARTA RONDA ESTUDIO NACIONAL DE SERO-EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN ESPAÑA*. <https://www.mscbs.gob.es/gabinetePrensa/notaPrensa/pdf/15.12151220163348113.pdf> (2020).
16. Ward, S., Lindsley, A., Courter, J. & Assa'ad, A. Clinical testing for COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 23–34 (2020).



17. Lai, C. K. C. & Lam, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **538**, (2020).
18. Fernandes, L. L. *et al.* Saliva in the Diagnosis of COVID-19: A Review and New Research Directions. *Journal of Dental Research* vol. 99 1435–1443 (2020).
19. Cheng, M. P. *et al.* Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Annals of internal medicine* vol. 172 726–734 (2020).
20. Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. & Adley, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* **28**, 232–254 (2010).
21. Santiago, I. Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing. *ChemBioChem* vol. 21 2880–2889 (2020).
22. Böger, B. *et al.* Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am. J. Infect. Control* **49**, 21–29 (2021).
23. Keightley, M. C., Sillekens, P., Schippers, W., Rinaldo, C. & St. George, K. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J. Med. Virol.* **77**, 602–608 (2005).
24. Wu, Q. *et al.* INSIGHT: A population-scale COVID-19 testing strategy combining point-of-care diagnosis with centralized high-throughput sequencing. *Sci. Adv.* **7**, eabe5054 (2021).
25. Johnson, M. *Many Initiatives Turning to RT-LAMP as Alternative to PCR for Rapid COVID-19 Screening Assays.* (2020).
26. Song, J. *et al.* Two-stage isothermal enzymatic amplification for concurrent multiplex molecular detection. *Clin. Chem.* **63**, 714–722 (2017).
27. El-Tholoth, M., Bau, H. H. & Song, J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. *ChemRxiv* (2020) doi:10.26434/chemrxiv.11860137.v1.
28. Zhu, X. *et al.* Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosens. Bioelectron.* **166**, 112437 (2020).
29. Wang, R. *et al.* opvCRISPR: One-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection. *Biosens. Bioelectron.* **172**, (2021).
30. Ding, X., Yin, K., Li, Z. & Liu, C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *bioRxiv* 2020.03.19.998724 (2020) doi:10.1101/2020.03.19.998724.
31. Rauch, J. N. *et al.* A Scalable, easy-to-deploy, protocol for Cas13-based detection of SARS-CoV-2 genetic material. *bioRxiv* 2020.04.20.052159 (2020) doi:10.1101/2020.04.20.052159.
32. Zhang, X. *et al.* Electrical probing of COVID-19 spike protein receptor binding domain via a graphene field-effect transistor. *arXiv* (2020).
33. McFee, R. B. COVID-19 - A Brief Review of Radiology Testing. *Disease-a-Month* vol. 66

- (2020).
34. Waller, J. V. *et al.* Diagnostic Tools for Coronavirus Disease (COVID-19): Comparing CT and RT-PCR Viral Nucleic Acid Testing. *American Journal of Roentgenology* vol. 215 834–838 (2020).
  35. Diao, B. *et al.* Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 289.e1-289.e4 (2021).
  36. Alassi, A., Benammar, M. & Brett, D. Quartz crystal microbalance electronic interfacing systems: A review. *Sensors (Switzerland)* **17**, 1–41 (2017).
  37. Pohanka, M. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials (Basel)*. **11**, (2018).
  38. Pohanka, M. The piezoelectric biosensors: Principles and applications, a review. *Int. J. Electrochem. Sci.* **12**, 496–506 (2017).
  39. Pohanka, M. Piezoelectric biosensor for the determination of Tumor Necrosis Factor Alpha. *Talanta* **178**, 970–973 (2018).
  40. Pishva, P. & Yüce, M. Nanomaterials to tackle the COVID-19 pandemic. *Emergent Mater.* (2021) doi:10.1007/s42247-021-00184-8.
  41. Scarano, S., Dausse, E., Crispo, F., Toulmé, J. J. & Minunni, M. Design of a dual aptamer-based recognition strategy for human matrix metalloproteinase 9 protein by piezoelectric biosensors. *Anal. Chim. Acta* **897**, 1–9 (2015).
  42. Li, D. *et al.* A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4146–4154 (2011).
  43. Dutta, N. K., Mazumdar, K. & Gordy, J. T. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *J. Virol.* **94**, (2020).
  44. Zeng, W. *et al.* Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 618–623 (2020).
  45. Banyard, A. C. *et al.* Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. *Front. Microbiol* **10**, 1462 (2019).
  46. Abid, S. A. *et al.* Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. *Life Sci.* **273**, 119117 (2021).
  47. Acquah, C. *et al.* Deploying aptameric sensing technology for rapid pandemic monitoring. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1010–1022 (2016).
  48. Vorobyeva, M. A., Davydova, A. S., Vorobjev, P. E., Pyshnyi, D. V. & Venyaminova, A. G. Key aspects of nucleic acid library design for in vitro selection. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
  49. CAST - TPR - Two-Photon Research. <https://www.twophotonresearch.com/news/cast>.
  50. Home | PinpointScience. <https://www.pinpointscience.com/>.
  51. Quartz Crystal Microbalance - QCM200. <https://www.thinksrs.com/products/qcm200.html>.

52. Timani, K. A. *et al.* Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS. *J. Clin. Virol.* **30**, 309–312 (2004).
53. Ogando, N. S. *et al.* SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J. Gen. Virol.* **101**, 925–940 (2020).
54. Ahn, D. G. *et al.* RNA aptamer-based sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Analyst* **134**, 1896–1901 (2009).
55. Invitrogen. pTrcHis A, B, & C - Vectors for Expression of Recombinant Proteins Containing N-Terminal 6xHis Tags in E. coli. (2008).
56. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, co - Nucleotide - NCBI.  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_045512.2?report=genbank&from=21563&to=25384](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_045512.2?report=genbank&from=21563&to=25384).
57. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W. & Liu, S. wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 41 1141–1149 (2020).
58. Walls, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292.e6 (2020).
59. Ke, Z. *et al.* Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* **588**, 498–502 (2020).
60. Cesewski, E. & Johnson, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.* **159**, (2020).
61. Song, Y. *et al.* Discovery of Aptamers Targeting the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Anal. Chem.* **92**, 9895–9900 (2020).
62. Cho, S. J., Woo, H. M., Kim, K. S., Oh, J. W. & Jeong, Y. J. Novel system for detecting SARS coronavirus nucleocapsid protein using an ssDNA aptamer. *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 535–540 (2011).
63. Zhang, L. *et al.* Discovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers. *Chem. Commun.* **56**, 10235–10238 (2020).
64. Tombelli, S., Mascini, M. & Turner, A. P. F. Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 929–936 (2002).
65. The Reusability of Aptamers for Affinity Chromatography - Aptamer Group.  
<https://aptamergroup.com/the-reusability-of-aptamers-for-affinity-chromatography/>.
66. Chermat-Aourasse, N. & Kesri, R. Corrosion-Electrochemical behavior of 13% chromium (Cr) martensitic stainless steel in hydrochloric acid (HCl) solutions. *Prot. Met.* **43**, 344–352 (2007).
67. Hajian-Tilaki, K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine* vol. 4 627–635 (2013).
68. Silva Fuente-Alba, C. & Molina Villagra, M. Likelihood ratio (razón de verosimilitud):

definición y aplicación en Radiología. *Rev. Argentina Radiol.* **81**, 204–208 (2017).

69. Este es el rango de precios de las pruebas PCR en varios países | Factual. <https://factual.afp.com/este-es-el-rango-de-precios-de-las-pruebas-pcr-en-varios-paises>.
70. Servicios y pruebas COVID-19 | e-quirónsalud. <https://e-quironsalud.es/26-test-covid>.
71. Precios especiales en PCRs y test de antígenos para toda la población asegurada | Assistència Sanitària. <https://www.asc.es/es/precios-pcr>.

## 8. Anexo I

Secuencia del gen de la glicoproteína de superficie (S) de SARS-CoV-2, formato FASTA <sup>56</sup>:

>NC\_045512.2:21563-25384 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome

```
ATGTTTGTTTTCTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACCAGAACTCAAT
TACCCCTGCATACACTAATTCTTTCACACGTGGTGTGTTATTACCCTGACAAAGTTTTTCAGATCCTCAGT
TTTACATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACCTTTCTTTCCAATGTTACTTGGTTCCATGCTATACATGTC
TCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCCTACCATTTAATGATGGTGTGTTATTTTGCTT
CCACTGAGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCTGAAGACCCAGTCCCT
ACTTATTGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAGTCTGTGAATTTCAATTTGTAATGATCCATT
TTGGGTGTTTATTACCACAAAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGTGCGA
ATAATTGCACTTTTGAATATGTCTCTCAGCCTTTCTTATGGACCTTGAAGGAAAACAGGGTAATTTCAA
AAATCTTAGGGAATTTGTGTTTAAAGAATATTGATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACGCCTATT
AATTTAGTGCCTGATCTCCCTCAGGGTTTTTCGGCTTTAGAACCATTGGTAGATTGGCAATAGGTATTA
ACATCACTAGGTTTCAAACCTTACTTGCTTTACATAGAAGTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTCAGG
TTGGACAGCTGGTGCTGCAGCTTATTATGTGGGTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAAAATATAAT
GAAAATGGAACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCTCAGAAACAAAGTGACGTTGA
AATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAACCTCTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGT
TAGATTTCTAATATTACAACTTGTCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTGTCATCTGTT
TATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCAT
TTTCCACTTTTAAAGTGTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGC
AGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGAT
TATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAATCTTGATTCTA
AGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGA
TATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTGTAATGGTGTGTAAGGTTTTAATTGTTACTTT
CCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTT
CTTTGAACTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAAAACAA
ATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTTAAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAAAAGTTTCTG
CCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGA
TTCTTGACATTACCATGTTCTTTTGGTGGTGTGAGTGTATAACACCAGGAACAAATACTTCTAACCA
GGTTGCTGTTCTTTATCAGGATGTTAACTGCACAGAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTACT
CCTACTTGGCGTGTTTATTCTACAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGCTG
AACATGTCAACAACCTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAGACTCA
GACTAATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCAATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGT
GCAGAAAATTCAGTTGCTTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTTACCA
CAGAAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGATTCAAC
TGAATGCAGCAATCTTTTGTGCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAACCGTGCTTTAACTGGAATA
GCTGTTGAACAAGACAAAAACACCAAGAAGTTTTTGCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACACCACCAA
TTAAAGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCACAAATATTACCAGATCCATCAAACCAAGCAAGAGGTCATT
TATTGAAGATCTACTTTTCAACAAAGTGACACTTGACAGATGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGC
CTTGGTGATATTGCTGCTAGAGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTTAAACGGCCTTACTGTTTTGCCACCTT
TGCTCAGAGATGAAATGATTGCTCAATACACTTCTGCACTGTTAGCGGGTACAATCACTTCTGGTTGGAC
CTTGGTGACAGGTGCTGCATTACAAATACCATTGCTATGCAAATGGCTTATAGGTTTAAATGGTATTGGA
```

GTTACACAGAATGTTCTCTATGAGAACCAAAAATTGATTGCCAACCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAAA  
TTCAAGACTCACTTTCTCCACAGCAAGTGCACTTGAAAACTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCACA  
AGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATC  
CTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTT  
TGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTAC  
TAAAATGTCAGAGTGTGTACTTGGACAATCAAAAAGAGTTGATTTTTGTGGAAAGGGCTATCATCTTATG  
TCCTTCCCTCAGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGA  
ACTTCACAACCTGCTCCTGCCATTTGTCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTTTC  
AAATGGCACACACTGGTTTGTAAACACAAAGGAATTTTTATGAACCACAAATCATTACTACAGACAACACA  
TTTGTGTCTGGTAACTGTGATGTTGTAATAGGAATTGTCAACAACACAGTTTATGATCCTTTGCAACCTG  
AATTAGACTCATTCAAGGAGGAGTTAGATAAATATTTAAGAATCATACATCACCAGATGTTGATTTAGG  
TGACATCTCTGGCATTAAATGCTTCAGTTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCC  
AAGAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCAT  
GGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAATTATGCTTTGCTGTAT  
GACCAGTTGCTGTAGTTGTCTCAAGGGCTGTTGTTCTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGACGAC  
TCTGAGCCAGTGCTCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAA

## 9. Anexo II

<b>Tabla I. Productos necesarios para la puesta en marcha de Aptazogen</b>		
Producto		Coste estimado (€)
Reactivos/kits principales	Células Vero E6	600
	Medio mínimo esencial Eagle	50
	Suero bovino fetal	140
	Penicilina-estreptomicina	20
	DEAE-Dextrano	60
	Trizol (Invitrogen)	270
	Transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen)	330
	dNTP mix	30
	Cebadores aleatorios	190
	Rnasa H	170
	Vectores de expresión bacteriana pTrcHis A, B, C (Invitrogen)	870
	<i>SacI</i>	50
	<i>KpnI</i>	80
	Cebadores estándar customizados	10
	DNA polimerasa LA Taq (TaKaRa)	200
	Kit de purificación mi-PCR	40
	DNA ligasa T4	40
	IPTG	70
	SDS	90
	Acrilamida	500
	Azul Coomassie	150
	Agarosa Ni-NTA	280
	Kit de ensayo proteico II (Bio-Rad)	260
	Biblioteca de ssDNA	-
	DNA polimerasa Pfu (Promega)	80
	Cebadores 20 mer biotinilados en 5'	40
	Cebadores 20 mer fosforilados en 5'	30
	$\lambda$ -exonucleasa	90
	Resina de sefarosa con estreptavidina	470
	Secuenciación Sanger SCSIE	16
	Placas multipocillo con níquel	260
	Tween-20	10
	Peroxidasa de rábano (HRP)-estreptavidina	240
	Ácido sulfúrico	30
	Diclorhidrato de o-fenilendiamina	80
	11-mercaptoundecanol	80
	Epiclorohidrina	20
	Bis-2-metoxietil éter	70
	Dextrano básico	430
	Ácido bromoacético	280
	N-hidroxisuccinimida	60
	EDAC	90
	Estreptavidina	150
	Clorhidrato de etanolamina	50

	Nanopartículas de óxido de hierro de 30 nm con estreptavidina	830
	D-biotina	140
Otros reactivos de uso amplio	Isopropanol	90
	Etanol	60
	Fenol	380
	PBS	40
	Persulfato amónico	10
	Temed	50
	Tris-HCl	30
	Glicina	40
	Tris	70
	NaCl	40
	MgCl <sub>2</sub>	50
	DTT	50
	BSA	20
	NaOH	20
	HCl	30
	Medios de cultivo	1000
Aparataje	Sistema de Microbalanza de Cristal de Cuarzo QCM200 (Stanford Research Systems)	2740
	Centrífuga de eppendorfs	4000
	Termobloque	600
	Cabina de flujo	2000
	Termociclador	10000
	Kit básico de cuantificación 4 Qubit	2800
	Espectrofotómetro	10000
	Sonicador	1000
	Vórtex	300
	Rotador	500
	Agitador magnético	200
	Separador magnético	1000
	Balanza de precisión	2000
	Material de vidrio, pipetas, material de plástico y otro material fungible	10000
Suma total		57100



<b>Tabla II. Desglose del coste de Aptazovid</b>				
Producto	Precio de venta aprox.	Cantidad/ ensayo	Cantidad 20 ensayos	Coste 20 ensayos (€)
PBS	40 € / 1 L	2 ml	40 ml	1.2
HCl	25 € / 1 L (1M)	0.2 µl	4 µl	0.0001
DNA polimerasa Pfu (Promega)	80 € / 100 U	2.5 U	2.5 U	2
Cebadores 20 mer biotinilados en 5'	40 € / 100 µl (50 pmol µl <sup>-1</sup> )	10 pmol	0.2 µl	0.08
Cebadores 20 mer fosforilados en 5'	30 € / 100 µl (50 pmol µl <sup>-1</sup> )	10 pmol	0.2 µl	0.06
dNTP mix (10 mM de cada)	30 € / 200 µl	1 µl	1 µl	0.15
λ-exonucleasa	90 € / 1000 U (100 µl)	1 µl	1 µl	0.9
Cristales de cuarzo, electrodos Cr/Au	45 € / unidad	1 unidad	1 unidad	45
11-mercaptoundecanol	80 € / 1 g	0.1 mg	0.1 mg	0.008
Epiclorohidrina	20 € / 25 ml	0.02 ml	0.02 ml	0.016
Bis-2-metoxietil éter	70 € / 100 ml	0.03 ml	0.03 ml	0.021
Dextrano básico	430 € / 100 g	0.15 g	0.15 g	0.65
Ácido bromoacético	280 € / 5 kg	0.07 g	0.07 g	0.004
N-hidroxisuccinimida	60 € / 25 g	0.001 g	0.001 g	0.002
EDAC	90 € / 100 mg	0.008 g	0.008 g	7.2
Estreptavidina	150 € / 1 mg en 1 ml	0.04 ml	0.04 ml	6
Clorhidrato de etanolamina	50 € / 250 g	0.02 g	0.02 g	0.004
Nanopartículas de óxido de hierro de 30 nm con estreptavidina	830 € / 5 ml (1 mg ml <sup>-1</sup> )	10 µl	200 µl	30
D-biotina	140 € / 1 g	0.25 mg	5 mg	0.8
<b>Total</b>				<b>94.1</b>